

บทที่ 3

การทดลอง

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Ammonium thiocyanate	(A.R.)
Boric acid	(A.R.)
Bromocresol green	(A.R.)
Copper sulphate	(A.R.)
95% Ethanol	(A.R.)
Ferric indicator	(A.R.)
Formaldehyde	(A.R.)
Glucose	(A.R.)
Hydrochloric acid	(A.R.)
Magnesium oxide	(A.R.)
Methyl red	(A.R.)
Nitric acid	(A.R.)
Potassium sulphate	(A.R.)
Petroleum ether	(A.R.)
Silver nitrate	(A.R.)
Sodium chloride	(A.R.)

Sodium hydroxide (A.R.)

Sulphuric acid (A.R.)

Neutrase[®] 0.5 L (0.5 unit/g) Novo Industri A/S Copenhagen

Denmark

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldatherm และ Vapodest 1, Gerhardt, KT 85)

ชุดสกัดไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic, S-166)

Hot Air Oven (WTE Binder, E 53)

Muffle Furnace (Carbolite, MEL 11-2)

Shaking Water Bath (DT Hetotherm, CB 60)

เครื่อง Centrifuge ความจุหมัก -30 ถึง 40 °C

(Heraeus-Christ, Verifuge K)

Spray Drier (Lab-plant, SD-04)

pH Meter (Corning, M 220)

เครื่องชั่ง Analytical Balance (Sartorius, A 200S)

เครื่องชั่ง Top Loading (Sartorius, B 3100S)

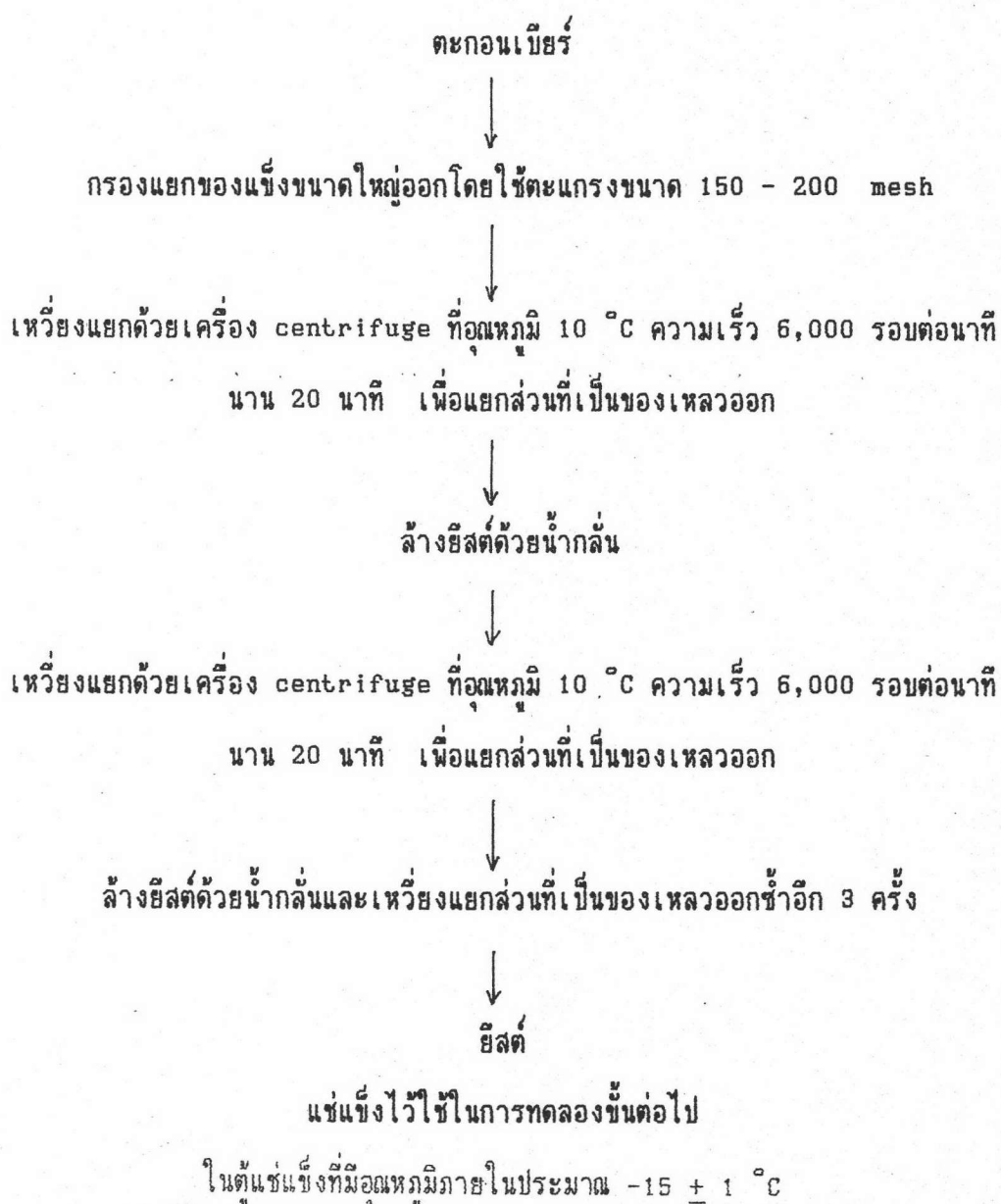
ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ : Bottom-fermenting brewer's yeast

(*Saccharomyces carlsbergensis*)

จากบริษัท ไทยอมฤตบริวเวอรี่ จำกัด

1. การเตรียมวัตถุดิบ



2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน สารเยื่อใย เถ้า ตามวิธี AOAC (1980) และ คาร์โบไฮเดรต (โดยการหักลบ) ของยีสต์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

3.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรดต่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสม

ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวเองของยีสต์ โดยนำยีสต์มาเตรียม yeast suspension ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 10 % (w/v) ควบคุมให้เกิดการย่อยสลายตัวเองในแต่ละภาวะโดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ตลอดเวลา 18 ชั่วโมง แล้วต้มในน้ำเดือด 2 นาทีเพื่อยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์

ตัวแปรที่ศึกษาคือ

- อุณหภูมิ (°C) ได้แก่ 35, 40, 45 และ 50
- ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ได้แก่ 4.0, 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0

(ปรับด้วย sodium hydroxide หรือ hydrochloric acid)

ประเมินผลด้วยการติดตามปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำตัวอย่างที่ได้จากแต่ละภาวะมาเหวี่ยงแยกส่วนที่เป็นของแข็งและของเหลวออกจากกัน นำแต่ละส่วนมาอบที่ 100 °C จนได้น้ำหนักคงที่

คำนวณหาปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์

$$\text{ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ (\%)} = \frac{W_1}{W_1 + W_2} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือน้ำหนักแห้งของส่วนสารละลาย

W_2 คือน้ำหนักแห้งของส่วนของแข็ง

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 4 x 5 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกภาวะที่ให้ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์สูงที่สุดไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 ศึกษาปริมาณของแห้ง(dried yeast)ใน yeast suspension ที่เหมาะสม

ทดลองหาปริมาณของแห้งใน yeast suspension ที่เหมาะสม โดยแปร
ปริมาณของแห้งเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 % (w/v) นำมาควบคุมให้เกิดการย่อยสลายโดย
ใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.1 เช่าด้วยความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ตลอดเวลา 18 ชั่วโมง
ประเมินผลตามวิธีในข้อ 3.1

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely
Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple
Range Test เลือก yeast suspension ที่มีปริมาณของแห้งสูงสุดและให้ปริมาณอโตไลเอส
ในระดับสูงไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาผลของสารเคมีและเอนไซม์ต่อการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

3.3.1 ศึกษาผลของสารเคมีต่อการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ทดลองหาชนิดและปริมาณของสารเคมีที่เหมาะสม โดยเติมสารเคมี
ลงใน yeast suspension ที่มีปริมาณของแห้งตามที่เลือกได้จากข้อ 3.2 ควบคุมให้เกิดการย่อย
สลายโดยใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.1 เช่าด้วยความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ตลอดเวลา
4 ชั่วโมง

ตัวแปรที่ศึกษาคือ

- ชนิดของสารเคมี ได้แก่ sodium chloride, glucose
และ 95% ethanol
- ปริมาณที่ใช้ ได้แก่ 1 และ 5 % (w/v สำหรับ sodium
chloride และ glucose) และ 1 และ 5 % (v/v
สำหรับ 95% ethanol)



ประเมินผลโดยติดตามปริมาณโปรตีนในอโตไลเอส วางแผน
การทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกภาวะที่มี
ปริมาณโปรตีนสูงสุดไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2 ศึกษาผลของสารเคมีร่วมกับเอนไซม์ Neutrase[®] 0.5 L ต่อการย่อยตัวเองของยีสต์ ทดลองหาปริมาณเอนไซม์ Neutrase[®] 0.5 L ที่เหมาะสม โดยแปรปริมาณเอนไซม์เป็น 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.20 % (v/v) เติมลงใน yeast suspension ที่มีปริมาณของแข็งตามที่เลือกได้จากข้อ 3.2 ซึ่งมีสารเคมีที่เลือกได้จากข้อ 3.3.1 อยู่ ควบคุมให้เกิดการย่อยสลายโดยใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.1 เช้าด้วยความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที ตลอดเวลา 4 ชั่วโมง

ประเมินผลโดยการติดตามปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และ อัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอโตไลเสท วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกปริมาณเอนไซม์ต่ำสุดที่ให้อโตไลเสทซึ่งมีปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และ อัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในระดับสูง ไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

กรณีผลการทดลองที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทดลองซ้ำใหม่แต่ไม่ต้องเติมสารเคมีที่เลือกได้จากข้อ 3.3.1

3.4 ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ การแช่แข็งยีสต์ การเขย่าขณะย่อยสลาย และ การใช้เอนไซม์ โดยทดลองผลิตยีสต์อโตไลเสทโดยใช้ (1) ยีสต์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและเขย่า (2) ยีสต์ที่ผ่านการแช่แข็งแต่ไม่เขย่า (3) ยีสต์ที่ผ่านการแช่แข็งและเขย่า และ (4) ยีสต์ที่ผ่านการแช่แข็ง เติมเอนไซม์ Neutrase[®] 0.5 L ในระดับที่เลือกได้จากข้อ 3.3.2 และเขย่าโดยใช้ yeast suspension ที่มีปริมาณของแข็งตามที่เลือกได้จากข้อ 3.2 ควบคุมให้เกิดการย่อยสลายโดยใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.1 เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ในกรณีที่มีการเขย่าให้ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที)

ประเมินผลโดยการติดตามปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีน และ อัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ในอโตไลเสททุก 1 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างอโตไลเสทแช่แข็งไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณต่างๆ ภายหลัง วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4. การอบแห้งยีสต์อโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

4.1 ศึกษาการอบแห้งยีสต์อโตไลเสทโดยตู้อบลมร้อน

4.1.1 ศึกษาอุณหภูมิในการอบแห้งโดยตู้อบลมร้อน

ทดลองนำยีสต์อโตไลเสทที่ผลิตได้จากวิธีที่เลือกได้จากข้อ 3

มาระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 100 °C จนกระทั่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดประมาณ 70 % และอบแห้งโดยตู้อบลมร้อน แปรอุณหภูมิ 3 ระดับคือ 90, 100 และ 110 °C จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นประมาณ 5 % นำมาบดเป็นผง

ประเมินผลโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring Test โดยพิจารณาสมบัติด้านกลิ่นรสเนื้อของซุปลิส (ศรีสมร, 2532) ที่เติมยีสต์อโตไลเสทผง ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกอุณหภูมิที่ได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงสุดไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.1.2 ศึกษาอัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณ

ไนโตรเจนทั้งหมดของยีสต์อโตไลเสทที่เหมาะสม

ทดลองนำยีสต์อโตไลเสทที่มีอัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโน

ไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 40, 50 และ 60 % มาระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 100 °C จนกระทั่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดประมาณ 70 % อบแห้งตามอุณหภูมิที่เลือกได้จากข้อ 4.1.1 จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นประมาณ 5 % แล้วบดเป็นผง

ประเมินผลโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring Test โดยพิจารณาสมบัติด้านกลิ่นรสเนื้อของซุปลิสที่เติมยีสต์อโตไลเสทผง ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน

จำนวน 10 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกอัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้คะแนนสูงสุดไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.2 ศึกษาการอบแห้งอีสต์อโตไลเซทโดยเครื่อง Spray drier

ทดลองนำอีสต์อโตไลเซทที่มีอัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด เป็น 40, 50 และ 60 % มาอบแห้งด้วยเครื่อง Spray drier (อุณหภูมิลมเข้า 180 °C อุณหภูมิลมออก 90 °C ความดันลม 30 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัตราการป้อน 1,700 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

ประเมินผลโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring Test โดยพิจารณาสมบัติด้านกลิ่นรสเนื้อของซูปส์ที่เติมอีสต์อโตไลเซทผง ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกอัตราส่วนของปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้คะแนนสูงสุดไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.3 ศึกษาผลของวิธีการอบแห้งอีสต์อโตไลเซท

เปรียบเทียบผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring Test โดยพิจารณาสมบัติด้านกลิ่นรสเนื้อของซูปส์ที่เติมอีสต์อโตไลเซทผงที่เลือกได้จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เลือกวิธีการอบแห้งที่ได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5. การปรุงแต่งอีสต์อโตไลเซทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

ทดลองเติม glucose และ น้ำมันมะพร้าวในอีสต์อโตไลเซท โดยเติม glucose 1 % (w/v) น้ำมันมะพร้าว 1 % (w/v) และ เติมหั้ง glucose และ น้ำมันมะพร้าว อย่างละ 1 % (w/v) ก่อนนำไปอบแห้งตามวิธีที่เลือกได้จากข้อ 4.3

ประเมินผลโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Scoring Test โดยพิจารณา สมบัติด้านกลิ่นรส เนื้อของซุปลีที่เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้ ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ได้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงสุดไว้ใช้ในการ ทดลองขั้นต่อไป

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน สารเยื่อใย เถ้า ตามวิธี AOAC (1980) และ คาร์โบไฮเดรต (โดยการหักลบ) ของสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ได้จากข้อ 5

7. การใช้ประโยชน์สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารในผลิตภัณฑ์บิสกิต ทดลองใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสที่เลือกได้จากข้อ 5 ในผลิตภัณฑ์บิสกิต (Crocker, 1989) โดยแปรปริมาณสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารเป็น 0, 1, 2 และ 3 % (โดยน้ำหนักแห้ง)

ประเมินผลโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ 9-Hedonic Scale โดยพิจารณา สมบัติด้านกลิ่นรส เนื้อของบิสกิตที่เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร ใช้ผู้ทดสอบทั่วไปจำนวน 20 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Randomized Complete Blocks Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

8. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในฮีสต์อโตไลสเทที่มีอัตราส่วนของ ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดประมาณ 40, 50 และ 60 % และ ฮีสต์อโตไลสเทฟงที่เลือกได้จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 และสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่ได้จาก ข้อ 5 โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amino acid analyzer (HITASHI KLA-3B) ที่กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข