บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์

1) พัฒนาวิธีการทางวิทยาศาสตร์สำหรับการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้นเซลลูโลส
2) ศึกษาลักษณะและความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบของแผ่นวุ้นและโครงสร้างร่างแหเซลลูโลสของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆ
3) ศึกษาอิทธิพลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติต่างๆของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างจากเชื้อ Agr 60 และ TISTR 975

3.2 วัตถุดิบ

น้ำมะพร้าวแก่ ซึ่งใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำมะพร้าวชุดเดียวกันตลอดการทดลอง โดยน้ำมะพร้าวทั้งหมดถูกผสมให้เข้ากันและต้มให้เดือดนาน 10 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Acetobacter spp. Agr60 จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร และ *Acetobacter* spp. TISTR 975 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองและทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2-3 สัปดาห์

3.5 <u>ศึกษาสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบและโครงสร้างร่างแหเซลลูโลสของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆ</u>

3.5.1 คัดเลือกตัวอย่างแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวสดชนิดต่างๆ

แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆซึ่งใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบและโครงสร้างร่างแหเซลลูโลสเป็นแผ่นวุ้นที่ผลิตจากโรงผลิตวุ้นน้ำมะพร้าวของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ตัวอย่างที่นำมาศึกษาสุ่มมาจากแผ่นวุ้นที่ผ่านการคัดแยกแล้วโดยพนักงานในโรงผลิตด้วยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ใช้ในโรงผลิตและอุตสาหกรรมวุ้นน้ำมะพร้าว ได้แก่ การทดสอบโดยการกดด้วยนิ้วมือ ตัวอย่างแผ่นวุ้นแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามลักษณะเนื้อสัมผัส ดังนี้

(1) แผ่นวุ้นชนิดนิ่ม ซึ่งมีเนื้อสัมผัสนิ่มมากและสามารถใช้นิ้วมือกดทะลุแผ่นวุ้นได้ง่าย เมื่อถูกยกแผ่นวุ้นจะเสียรูปตามน้ำหนัก ดังรูปที่ 20a

(2) แผ่นวุ้นชนิดแน่น ซึ่งมีเนื้อสัมผัสแน่นแต่ไม่แข็งมาก สามารถใช้นิ้วมือจิกกดให้ทะลุลงไปในเนื้อวุ้นได้หากใช้แรงกดมาก เมื่อถูกยกแผ่นวุ้นจะโค้งงอตามน้ำหนัก ดังรูปที่ 20b และ 21 (ซ้าย)

(3) แผ่นวุ้นชนิดแข็ง ซึ่งมีเนื้อสัมผัสเหนียวและแข็งมาก ไม่สามารถใช้นิ้วกดให้ทะลุลงไปในเนื้อวุ้นได้แม้จะใช้แรงกดมากก็ตาม นอกจากนี้เมื่อถูกยกแผ่นวุ้นมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งไม่โค้งงอ ดังรูปที่ 20c และ 21 (ขวา)

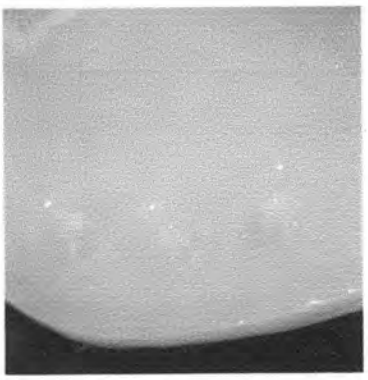
ทำการสุ่มตัวอย่างแผ่นวุ้นมาชนิดละ 4 แผ่น ล้างให้สะอาดและเก็บโดยการแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำมาทดสอบสมบัติต่างๆ ในระหว่างการเก็บแผ่นวุ้นจะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่แช่แผ่นวุ้น เนื่องจากน้ำตาลที่เหลือในแผ่นวุ้นอาจทำให้เชื้ออื่นๆที่ปนเปื้อนเจริญได้ในระหว่างการเก็บ อย่างไรก็ตามจะต้องไม่เก็บตัวอย่างแผ่นวุ้นไว้นานเกินไปเนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้หรือเชื้อรา

3.5.2 การวัดน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้น

ก่อนจะนำแผ่นวุ้นไปหาองค์ประกอบจะต้องทำการชั่งน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นเสียก่อน โดยการแขวนแผ่นวุ้นในอากาศเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก และรีบนำแผ่นวุ้นลงแช่ในน้ำตามเดิม เหตุที่ต้องทำการจับเวลาเนื่องจากแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวสดมีการสูญเสียน้ำได้ง่ายทำให้น้ำหนักของแผ่นวุ้นเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ทั้งนี้เนื่องจากน้ำในแผ่นวุ้นจะเหยออกมาตลอดเวลา แม้แต่การวางแผ่นวุ้นบนภาชนะนั้นน้ำหนักของตัวแผ่นวุ้นเองจะกดและทำให้น้ำถูกบีบออกมาได้

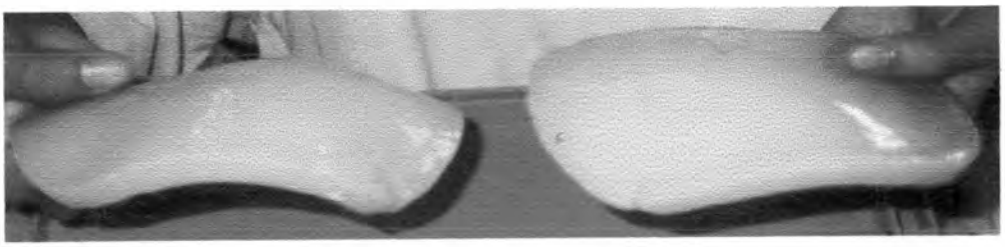
(a)

(b)



(c)

รูปที่ 20 แผ่นวุ้นเซลลูโลสที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆเมื่อทดสอบโดยการกดด้วยนิ้วมือ (a) แผ่นวุ้นชนิดนิ่ม (b) แผ่นวุ้นชนิดแน่น และ (c) แผ่นวุ้นชนิดแข็ง



รูปที่ 21 ลักษณะการโค้งงอของแผ่นวุ้นเซลลูโลสคุณภาพดีเมื่อถูกยก (ซ้าย) แผ่นวุ้นชนิดแน่น และ (ขวา) แผ่นวุ้นชนิดแข็ง

3.5.3 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของแผ่นวุ้น

3.5.3.1 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสโดยการเจาะ

นำตัวอย่างแผ่นวุ้นที่แช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ขึ้นมาวัดค่าแรงที่ใช้ในการเจาะด้วยเครื่อง Texture Analyzer (รุ่น TA.XT2i บริษัท Stable Micro Systems ประเทศอังกฤษ) โดยใช้หัวเจาะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร แปรความเร็วในการวัดที่ 1, 5 และ 10 มม/ วินาที หัววัดจะกดลงบนผิวหน้าตัวอย่างเพื่อเจาะเข้าไปในเนื้อตัวอย่าง โดยตั้งระยะการกดไว้ 10 มิลลิเมตรจากผิวหน้าของตัวอย่าง ตัวอย่างแผ่นวุ้นที่มีขนาดประมาณ 18x30 ซม^2 และมีความหนาประมาณ 17-18 มม ถูกสุ่มตำแหน่งเพื่อวัดค่าแรงเจาะที่ความเร็วต่างๆความเร็วละ 6 ตำแหน่งต่อแผ่น โดยแต่ละตำแหน่งที่เจาะต้องห่างจากขอบของแผ่นวุ้นและตำแหน่งอื่นๆไม่ต่ำกว่า 3 ซม แผนการทดลองเป็นแบบ Factorial in Completely Randomized Design ขนาด 3x3 โดยใช้ตัวอย่างแผ่นวุ้น 3 ชนิดและความเร็วในการเจาะ 3 ค่า ค่าแรงเจาะได้จากแรงสูงสุดที่ใช้ในการเจาะตัวอย่างซึ่งหาได้โดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรมของเครื่องโดย Texture Analyzer มีค่า force resolution เท่ากับ 1 กรัม จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS (SPSS Inc., สหรัฐอเมริกา) เพื่อทดสอบผลกระทบหลักและผลกระทบร่วมของชนิดและความเร็วในการเจาะ ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test ความเร็วในการเจาะที่เหมาะสมซึ่งสามารถแยกตัวอย่างชนิดต่างๆออกจากกันได้อย่างชัดเจนจะถูกนำไปใช้ในการวัดค่าแรงเจาะเพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติของแผ่นวุ้นในการทดลองตอนต่อไป

นอกจากนี้เนื่องจากเครื่อง Texture Analyzer นี้สามารถวัดความสูงของตัวอย่างได้โดยมีค่า range resolution เท่ากับ 0.0025 มม ดังนั้นความหนาของแผ่นวุ้นได้จากค่าความสูงของตัวอย่างที่วัดได้จากการทดสอบโดยใช้ค่า trigger force เท่ากับ 5 กรัม

3.5.3.2 การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสโดยการกด

ก่อนการทดสอบด้วยการทำ TPA จะต้องทำการเตรียมตัวอย่างโดยการตัดให้มีขนาดเท่ากับ 15x15 มม^2 และสูง 10 มม ในขณะตัดตัวอย่างจะต้องใช้มีดที่คมมากและรีบตัดให้เร็วที่สุด จากนั้นจะต้องแช่ตัวอย่างไว้ในน้ำตลอดเวลาจนกว่าจะนำไปทำการวัดด้วยเครื่อง Texture Analyzer ก่อนการวัดจะต้องนำชิ้นตัวอย่างที่ตัดแล้วขึ้นผึ่งบนตะแกรงและจับเวลาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักของชิ้นตัวอย่างก่อนนำไปวัดโดยใช้หัววัดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ตั้ง option ของการวัดเป็น TPA Mode และใช้ความเร็วในการกดคงที่เท่ากับ 1 มม/ วินาที ตั้งค่าให้หัววัดกดลงในตัวอย่างเท่ากับ 7 มิลลิเมตรจากผิวหน้าของชิ้นตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่กดแล้วมาผึ่งบนตะแกรงเป็นเวลา 5 นาทีและชั่งน้ำหนักชิ้นตัวอย่างหลังกดเพื่อนำไปคำนวณปริมาณน้ำที่สูญเสียออกจากชิ้นตัวอย่างเนื่องจากการกด

แผ่นวุ้นแต่ละแผ่นจะถูกสุ่มตำแหน่งสำหรับเตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ชิ้น แผนการทดลองเป็นแบบ Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ ค่าแสดงเนื้อสัมผัสต่างๆ ได้แก่ Hardness, Fracturability, Adhesiveness, Springiness, Cohesiveness และ Chewiness หาได้โดยอัตโนมัติด้วยโปรแกรมของเครื่องมือ จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าแสดงเนื้อสัมผัสต่างๆของแผ่นวุ้นทั้ง 3 ชนิด

3.5.4 ศึกษาองค์ประกอบของแผ่นวุ้น

หาองค์ประกอบของแผ่นวุ้นในด้านปริมาณของแข็งทั้งหมดต่อน้ำหนักเปียก (%total solid content) และปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียก (%cellulose content) โดยวิธีในภาคผนวก ข นำค่าที่ได้รวมถึงน้ำหนักเปียกของแผ่นวุ้นเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณน้ำต่อกรัมเซลลูโลส (water content per gram-cellulose) และปริมาณเซลล์แบคทีเรียในแผ่นวุ้น (cell content) ตามสูตรในภาคผนวก ข โดยแผนการทดลองเป็นแบบ Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของค่าแสดงเนื้อสัมผัสต่างๆของแผ่นวุ้นทั้ง 3 ชนิด และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของแผ่นวุ้นกับค่าแสดงลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆโดยโปรแกรม Excel (บริษัท Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

3.5.5 ศึกษาลักษณะของการสานร่างแหและเส้นใยเซลลูโลส

ศึกษาลักษณะของเส้นใยเซลลูโลสและการสานกันของร่างแหของแผ่นวุ้นชนิดต่างๆโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JSM-2410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น) ที่กำลังขยาย 500, 2,000, 5,000 และ 35,000 เท่า ทำการวัดขนาดเซลล์แบคทีเรีย เส้นใยเซลลูโลสและรูโพรงของร่างแหจากภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5,000 และ 35,000 เท่า

3.6 <u>ศึกษาอิทธิพลของปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดยเชื้อ Agr60 และ TISTR 975</u>

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมอาหารน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก1.2) ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นก่อนนำมาถ่ายโคโลนีของเชื้อจากหลอดแก้วที่มีอาหารลาดเอียงลงไป นำไปบ่มนาน 5 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเทับด้วยอาหารน้ำมะพร้าวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอีก 5 มิลลิลิตรเพื่อ

กระตุ้นการเจริญ บ่มนาน 3 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงถ่ายลงในอาหารน้ำมะพร้าวใหม่ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้หัวเชื้อขนาด 10% และบ่มนาน 2 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเซลลูโลสต่อไป โดยการเตรียมหัวเชื้อทำเช่นเดียวกันในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์

3.6.2 การหมักเพื่อผลิตแผ่นวุ้นโดยแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมลงในอาหารน้ำมะพร้าว

ทำการหมักเพื่อผลิตแผ่นวุ้นโดยควบคุมปริมาณสารอาหารและภาวะในการเลี้ยงให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ (สมคิด ธรรมรัตน์, 2531; อังคณา พันธุ์ศรี, 2541) ดังนี้

เตรียมอาหารน้ำมะพร้าวโดยนำน้ำมะพร้าวมากรองด้วยผ้าขาวบาง เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05%w/v แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1%w/v ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 4.75 ด้วยกรดอะซีติกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำไปต้มให้เดือด ช้อนเอาไขมันบนผิวหน้าออกแล้วจึงนำมาเติมน้ำตาลทรายในปริมาณ 0, 5 และ 10%w/v ถ่ายอาหารน้ำมะพร้าวดังกล่าวลงในภาชนะบรรจุที่ทำความสะอาดและต้มฆ่าเชื้อแล้วในขณะที่อาหารยังร้อนอยู่ โดยให้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.5 ซม ปิดภาชนะด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ รอจนอาหารน้ำมะพร้าวในภาชนะเย็นแล้วจึงเติมหัวเชื้อตั้งต้นของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ขนาด 10%v/v เขย่าให้เข้ากันและนำภาชนะไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 วัน จึงเก็บแผ่นวุ้นที่ได้มาทำการทดสอบต่อไป แผนการทดลองเป็นแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2x3 จำนวน 3 ซ้ำ

3.6.3 การทดสอบสมบัติต่างๆของแผ่นวุ้น

ทำการทดสอบสมบัติในด้านต่างๆ ได้แก่ ความหนา, น้ำหนักเปียก, ลักษณะเนื้อสัมผัสและองค์ประกอบของแผ่นวุ้นที่ได้ด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองในตอนที่ 3.5.2-3.5.4 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยต่างๆ ของแผ่นวุ้นที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมเท่ากับ 0, 5 และ 10% และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของแผ่นวุ้นกับค่าแสดงลักษณะเนื้อสัมผัสต่างๆโดยโปรแกรม EXCEL

3.7 <u>ศึกษาอิทธิพลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดยเชื้อ Agr60 และ TISTR 975</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.6.2 แต่เตรียมอาหารน้ำมะพร้าวให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสคงที่เท่ากับ 5%w/v แล้วแปรปริมาณแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เติมให้มีค่าเท่ากับ 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0%w/v แทน แผนการทดลองเป็นแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2x5จำนวน 3

ซ้ำและทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยต่างๆ ของแผ่นวุ้นที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่ปริมาณแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเท่ากับ 0, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0%

3.8 ศึกษาอิทธิพลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติของแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่สร้างโดยเชื้อ Agr60

วิเคราะห์ปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนในน้ำมะพร้าวด้วยเครื่อง CHNS/O Analyzer ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ค นำมาใช้ในการคำนวณปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารน้ำมะพร้าวสูตรต่างๆในการทดลองตอนที่ 3.6 และ 3.7 จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม EXCEL เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารน้ำมะพร้าวต่อสมบัติต่างๆของแผ่นวุ้น