บทที่ 4

วิธีทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

4.1.1 Lactobacillus delbrueckii TISTR 108

เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกลูโคส-ยีสต์สกัด-เปปโตน (GYP broth) pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและนำอาหารเหลว GYP ที่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Atlas et al, 1984) และหาปริมาณกรดแลคติคตามวิธีในภาคผนวก ก ทุก 2 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณกรดแลคติคที่ได้กับเวลา

4.1.2 Saccharomyces rouxii TISTR 5058

เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด (YM broth) pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำอาหารเหลว YM ที่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (Atlas et al, 1984) และหาปริมาณแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก ทุก 2 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้กับเวลา

4.2 การเตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายของเจลแคลเซียมอัลจิเนต

4.2.1 วิธีเตรียมสารแขวนลอยเซลล์จุลินทรีย์

L. delbrueckii ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกลูโคส-ยีสต์สกัด-เปปโตน (GYP broth) ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ส่วน S. rouxii ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด (YM broth) ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Buchanan and Gibbons, 1975 และ Kreger-van Rij, 1984)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์จุลินทรีย์ดังกล่าวเจริญเติบโตอยู่ ไปหมุนเหวี่ยงที่ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกของเหลวออก หลังจากนั้นล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และแขวนลอยเซลล์จุลินทรีย์ในสารละลายดังกล่าว (Tipayang and Kozaki, 1982)

4.2.2 <u>วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ร่วมกัน</u> (Tipayang and Kozaki, 1982)

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของ <u>L. delbrueckii</u>(pH 6.5) และสารแขวนลอยเซลล์ของ <u>S. rouxii</u> (pH 6.5) ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต (pH 6.5)ผสมให้เข้ากัน จากนั้น หยดส่วนผสมดังกล่าว (pH 6.5) ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (pH 6.7) อย่างช้าๆ ผ่านปิเปตซึ่งมีปลายเปิดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร เม็ดเจลที่ได้มีเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 3 มิลลิเมตร จากนั้นนำเม็ดเจลที่ได้ไปล้างด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เพื่อกำจัดเซลล์อิสระ และเก็บเม็ดเจลในสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

หมายเหตุ : (1) ทุกขั้นตอนในข้อ 4.2 ต้องกระทำภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ

(2) สารละลายปฏิกิริยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันคือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด (กลูโคส ร้อยละ 1)

(3) อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน คือ 35 องศาเซลเซียส

(4) ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน คือ 3 วัน

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ร่วมกัน

4.3.1 อัตราส่วนของสารแขวนลอยเซลล์ระหว่าง L. delbrueckii และ S. rouxii และร้อยละของสารแขวนลอยเซลล์จุลินทรีย์ทั้งสองในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงรูป

แปรอัตราส่วนของสารแขวนลอยเซลล์ระหว่าง L. delbrueckii และ S. rouxii 3 ระดับ คือ 1:1, 2:1 และ 1:2 แปรร้อยละของสารแขวนลอยเซลล์จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 4 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติแบบ factorial completely randomized design ขนาด 3 x 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ร้อยละ 3 และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 3

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของ L. delbrueckii และสารแขวนลอยเซลล์ของ S. rouxii ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตตามอัตราส่วนและร้อยละต่างๆ จากนั้นตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันตามวิธีในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด ตามภาวะที่กำหนดในหมายเหตุข้อ 4.2.2 จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติคและแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

4.3.2 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในการตรึงรูป

แปรความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 3, และ 4 แปรความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 3 ,และ 4 วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติแบบ factorial completely randomized design ขนาด 3 x 3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของ L. delbrueckii และสารแขวนลอยเซลล์ของ S. rouxii ตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3.1 และตามความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและสารละลายแคลซียมคลอไรด์ต่างๆ จากนั้นตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันตามวิธีในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด ตามภาวะที่กำหนดในหมายเหตุข้อ 4.2.2 จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค และแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

4.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน

4.4.1 ลักษณะแอคติวิตีด้าน pH (pH activity profile)

แปร pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน 5 ระดับ คือ pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0

4.4.2 ลักษณะแอคติวิตีด้านอุณหภูมิ (temperature activity profile)

แปรอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน 7 ระดับคือ 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติแบบ factorial completely randomized design ขนาด 5 x 7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันโดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด ตาม pH และอุณหภูมิต่างๆ จากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค และแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงาน ระหว่างเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน และเซลล์อิสระ

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด ตาม pH และอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 4.4 สำหรับเซลล์อิสระ เติมสารแขวนลอยเซลล์ตามอัราส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด และร้อยละของสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 4.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด เพาะเลี้ยงที่ pH และอุณหภูมิเดียวกันกับเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน ณ เวลาที่กำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค และแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.6 การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ของเจลแคลเซียมอัลจิเนตก่อนนำไปใช้งาน

4.6.1 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

4.6.1.1 วิธีทำลายเจลแคลเซียมอัลจิเนต (Tipayang and Kozaki,1982)

นำเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตมาล้าง ด้วยสารละลายแคลเซียม-คลอไรด์ จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) ในปริมาณที่มากเกินพอที่จะละลายเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นจะได้ของเหลวที่มีเซลล์จุลินทรีย์แขวนลอยอยู่

4.6.1.2 วิธีนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสามารถตรวจนับได้ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนจานตามวิธีในภาคผนวก ก

4.6.2 พิจารณาจากภาพถ่ายอิเลคตรอน (Fukushima et al, 1988)

แช่เม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (pH 6.7) ความเข้มข้น ร้อยละ 2 นาน 3 ชั่วโมง ถึงตลอดคืน เทสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ออก จากนั้นแช่ในเอธานอลความเข้มข้น ร้อยละ 35, 50, 70, 80, 95 และ 100 ความเข้มข้นละ 15 นาที ตามลำดับ อบเม็ดเจลให้แห้งสนิท เคลือบทองด้วยเครื่อง fine coat 5 นาที ตรวจดูโครงสร้างด้วยเครื่อง scanning electron-microscope ที่กำลังขยาย 3500 เท่า

4.7 การศึกษาผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีต่อเสถียรภาพของเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนต

แปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด-มอลต์สกัด 10 ระดับ คือ ร้อยละ 11-20 โดยน้ำหนัก วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติแบบ completely randomized design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน โดยเติมสารละลายสำหรับหมักกรดแลคติค และแอลกอฮอล์ ตาม pH และอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 4.4 และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ ณ เวลาที่กำหนดนำสารละลายสำหรับหมักกรดแลคติคและแอลกอฮอล์มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติคและแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

4.8 <u>การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง</u>

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตจากข้อ 3.4.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบดังนี้

4.7.1 กรดแลคติค ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.7.2 แอลกอฮอล์ ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.7.3 ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.7.4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.7.5 กลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.7.6 pH โดยใช้เครื่องวัด pH วัดที่อุณหภูมิ 27 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส

4.7.7 ความถ่วงจำเพาะ โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ วัดที่อุณหภูมิ 27 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส

4.9 <u>การศึกษากระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วอย่างไม่ต่อเนื่องโดยเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนต</u>

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 เริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกัน โดยเติมสารละลายสำหรับหมักกรดแลคติค และแอลกอฮอล์ ตาม pH และอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 4.4 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ได้จากข้อ 4.7 เมื่อการหมักหยุดชงักหรือเกิดผลิตภัณฑ์เพียงเล็กน้อย เติมกลูโคส ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ติดตามกระบวนการหมักทุกวัน โดยนำสารละลายปฏิกิริยามาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค แอลกอฮอล์ กลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก วัด pH และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

4.10 ศึกษากระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ตรึงรูปร่วมกัน แบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนต

4.10.1 ความสัมพันธ์ระหว่าง retention time กับความดันตก

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 บรรจุเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนตลงในคอลัมน์ทั้ง 3 คอลัมน์ๆ ละ 70 กรัม เปิดวาล์วควบคุมการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์แรก แปรอัตราการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตในช่วง 1.7-20.0 มิลลิลิตรต่อนาที อ่านค่าความดันตกในหน่วยมิลลิเมตรปรอทจากมานอมิเตอร์ที่ต่อเชื่อมกับคอลัมน์แรก หาความสัมพันธ์ระหว่าง retention time กับความดันตก

4.10.2 การกำหนด retention time ที่เหมาะสมต่อการหมักน้ำซีอิ๊วอย่างต่อเนื่อง

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 บรรจุเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนตลงในคอลัมน์ทั้ง 3 คอลัมน์ๆ ละ 70 กรัม เปิดวาล์วควบคุมการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์แรก แปร retention time 12 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, และ 6.0 ชั่วโมง ใช้เวลาในการทดลองหมักอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมง โดยให้สารละลายขาออกจากคอลัมน์สุดท้ายไหลวนซ้ำ (recirculation) กับโปรตีนไฮโดรไลเซตเริ่มต้น ซึ่งจะไหลเข้าสู่คอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ตลอดช่วงการหมัก ติดตามกระบวนผลหมัก โดยนำสารละลายปฏิกิริยามาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค แอลกอฮอล์ และกลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก

เลือก retention time ที่เหมาะสมต่อการหมักอย่างต่อเนื่อง โดยพิจารณาจากปริมาณกรดแลคติคและแอลกอฮอล์สูงสุด และปริมาณกลูโคสเหลือน้อยที่สุด

4.10.3 การหมักกรดแลคติคและแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊ว โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนต

เตรียมเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันตามภาวะที่ได้จากข้อ 4.3 และตามวิธีตรึงรูปในข้อ 4.2.2 บรรจุเซลล์ตรึงรูปร่วมกันแบบห่อหุ้มในช่องตาข่ายเจลแคลเซียมอัลจิเนตลงในคอลัมน์ทั้ง 3 คอลัมน์ๆ ละ 70 กรัม เปิดวาล์วควบคุมการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์แรก โดยใช้ retention time ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.10.2 ควบคุมอุณหภูมิของโปรตีนไฮโดรไลเซตในคอลัมน์ด้วยน้ำที่ไหลในชั้นรอบนอกของคอลัมน์ตลอดเวลาที่ 30 องศาเซลเซียส สารละลายขาออกจากคอลัมน์สุดท้ายไหลวนซ้ำกับโปรตีนไฮโดรไลเซตเริ่มต้น ซึ่งจะไหลเข้าสู่คอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ตลอดช่วงการหมัก ติดตามกระบวนผลหมักโดยนำสารละลายปฏิกิริยามาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติค แอลกอฮอล์ และกลูโคสที่เหลือตามวิธีในภาคผนวก ก และวัด pH ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อปริมาณกลูโคสเหลือน้อยกว่า ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก จะเติมกลูโคสลงไปร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก เพื่อให้กระบวนการหมักดำเนินต่อไปจนกระทั่งปริมาณกรดแลคติคและแอลกอฮอล์อยู่ในระดับที่ต้องการ และ pH เท่ากับ 4.5

4.11 ศึกษาเสถียรภาพการใช้งานของเซลล์ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.11.1 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเจลแคลเซียมอัลจิเนต หลังจากใช้งานในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพตรวจนับโดยวิธีเพาะเลี้ยงบนจาน ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.11.2 การพิจารณาภาพถ่ายอิเลคตรอน

นำเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต หลังจากใช้งานในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มาเตรียมตามวิธีในข้อ 4.6.2

4.12 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

น้ำซีอิ๊วที่ได้จากการทดลองนำไปพาสเจอไรส์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และทำให้เย็น บรรจุในภาชนะที่สะอาด เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางทางเคมีฟิสิกส์ และประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในเชิงพาณิชย์ โดยกำหนดให้

น้ำซีอิวที่ผลิตได้ หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่ได้จากการทดลองและผ่านการพาสเจอไรส์

ตัวอย่างที่ 1 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 1

ตัวอย่างที่ 2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 2

ตัวอย่างที่ 3 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

4.12.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์

4.12.1.1 กรดแลคติค ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.12.1.2 แอลกอฮอล์ ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.12.1.3 ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.12.1.4 เกลือ (โซเดียมคลอไรด์) ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.12.1.5 กลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก

4.12.1.6 pH โดยใช้เครื่องวัด pH วัดที่อุณหภูมิ 27 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส

4.12.1.7 ความถ่วงจำเพาะ โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ วัดที่อุณหภูมิ 27 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส

4.12.2 การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสของน้ำซีอิ๊วที่ได้จากการทดลองและผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสในเชิงพาณิชย์ ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของน้ำซีอิ๊ว มอก.252-2521 (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน, 2530) โดยใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 15 คน ตรวจสอบลักษณะต่างๆ ดังนี้ ความใส กลิ่น รส และสี โดยให้คะแนนทุกลักษณะเต็ม 25 คะแนน และแต่ละลักษณะมีช่วงการให้คะแนนดังนี้

0 - 5 ไม่ดี

6 - 10 พอใช้

11 - 15 ดีพอใช้

16 - 20 ดี

21 - 25 ดีมาก

สำหรับลักษณะด้านรส กำหนดให้ผู้ทดสอบตรวจสอบโดยใช้ไข่ไก่ต้มสุกจิ้มผลิตภัณฑ์ วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติแบบ randomized complete block design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ตัวอย่างของแบบทดสอบการประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสของน้ำชีอิ๊วแสดงในภาคผนวก ข

4.12.3 <u>การวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่น</u>

การวิเคราะห์สารประกอบให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธีแก๊สโครมาโตกราฟ (gas chromatography) ให้เตรียมตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดเป็นซิลิโคน นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้กระบอกฉีดดูดแก๊สบริเวณช่องว่างเหนือของเหลว (head space) จำนวน 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาสารประกอบให้กลิ่น โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ Shimadzu GC-7G ซึ่งมีลักษณะดังต่อไปนี้

คอลัมน์: FFAP ร้อยละ 10 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร ทำด้วยเหล็กปลอดสนิม

อุณหภูมิของเตาอบ: 60-200 องศาเซลเซียส (3 องศาเซลเซียส)

แก๊สพาหะ: แก๊สไนโตรเจน มีอัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/นาที

เครื่องตรวจหา: Flame Ionization Detector (FID) ของ Shimadzu CR1A Chromatopac มีอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส

Ion source temperature: 180-200 องศาเซลเซียส

สารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบให้กลิ่น 10 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบชนิดของสารประกอบให้กลิ่นในน้ำซีอิ๊วที่ได้จากการทดลอง และผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสในเชิงพาณิชย์ มีรายละเอียดดังนี้

(1) Acetaldehyde (CH_3CHO)

จุดเดือด 20-21 องศาเซลเซียส

(2) Acetone (CH_3OCH_3)

จุดเดือด 55-56 องศาเซลเซียส

(3) n-Butyl alcohol ($CH_3(CH_2)_3OH$)

จุดเดือด 116-118 องศาเซลเซียส

(4) Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)

จุดเดือด 76-77 องศาเซลเซียส

(5) Ethyl alcohol (CH_3CH_2OH)

จุดเดือด 78-80 องศาเซลเซียส

(6) Ethyl formate ($HCOOC_2H_5$)

จุดเดือด 52-55 องศาเซลเซียส

(7) Isobutylaldehyde ($(CH_3)_2CHCHO$)

จุดเดือด 105-108 องศาเซลเซียส

(8) Methyl acetate (CH_3COOCH_3)

จุดเดือด 56-58 องศาเซลเซียส

(9) Methyl alcohol (CH_3OH)

จุดเดือด 63-65 องศาเซลเซียส

(10) n-Propyl alcohol ($CH_3CH_2CH_2OH$)

จุดเดือด 97-98 องศาเซลเซียส