บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 สารเคมี

1) 2,2-ไดฟีนีล-1-ไพคลิวไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

2) 2,2-เอไซโนบิส (3-เอทธิลเบนไทอะโซลีน-ซัลโฟนิกแอซิด (2,2-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline –sulphonic acid) (ABTS) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalie GmbH ประเทศเยอรมัน

3) โฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu phenol reagent) บริษัท BDH (VWR) PROLAB ประเทศอินเดีย

4) โพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate ; $K_2O_8S_2$) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

5) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide ; KOH) บริษัท BDH (VWR) PROLABO ประเทศอินเดีย

6) ฟอสเฟตบับเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffered saline pH 7.4 ; PBS) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

7) แมกนีเซียมคาร์บอเนต (Magnesium carbornate ; $MgCO_3$) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

8) อัลฟา อะไมเลส (Alpha amylase- Heat stable) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

9) อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

10) โปรตีเอส (Protease) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

11) ทะกะไดแอสเทส (Taka diastase) บริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

12) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) บริษัท Fluka chemika ประเทศสเปน

13) โซเดียม อะซีเตต (Sodium Acetate.3H_2O) บริษัท BDH (VWR) PROLABO ประเทศอินเดีย

14) ซีไลต์ (acid washed) บริษัท Fluka chemika ประเทศสเปน

15) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide; NaOH) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

16) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate ; Na_2CO_3) บริษัท BDH (VWR) PROLABO ประเทศอินเดีย

17) อะซิโตน (Acetone; CH_3COCH_3) Commercial Grade บริษัท Zen point ประเทศไทย

18) เอทานอล 99.7 – 100% (Ethanol 99.7 – 100% v/v; C_2H_2OH) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

19) เอธานอล 95% (Ethanol 95% ; C_2H_5OH) Commercial Grade บริษัท Zen point ประเทศไทย

20) กรดไฮโดรคลอริก 37% (Hydrochloric acid 37%; HCL) บริษัท Lab scan analytical Sciences ประเทศไอร์แลนด์ (Ireland)

21) เมธานอล (Methanol AR and HPLC grade) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

22) กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid ; H_2SO_4) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมัน

23) โซเดียมฟอสเฟตไดเบสิกแอนไฮดรัส (Sodium phosphate dibasic, anhydrous ; Na_2HPO_4) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

24) โซเดียมฟอสเฟตโมโนเบสิกโมโนไฮเดรต (Sodium phosphate monobasic monohydrate ; $NaH_2PO_4.H_2O$) บริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

25) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide ; C_2H_6OS DMSO) บริษัท Lab scan analytical sciences ประเทศไอร์แลนด์ (Ireland)

26) เฮปเทน (Heptane ; C_7H_{16}) บริษัท BDH (VWR) PROLABO ประเทศอินเดีย

27) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate ; Na_2CO_3) บริษัท BDH (VWR) PROLABO ประเทศอินเดีย

28) คลอรีนน้ำสูตรเข้มข้น (คลอรีนอิสระ 8.8 %w/w) บริษัทวิทยาศรม ประเทศไทย

29) เม็ดยาสำหรับวัดค่าคลอรีน (Acidifying GP tablet, Chlorine HR tablet) บริษัท Palintest ประเทศอังกฤษ

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) เปปโตน (Peptone water) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

2) อาหารแข็งมาตรฐาน (Plate count agar ; PCA) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

3) อาหารเหลวบริลเลียนกรีนแลกโตสไบล์บรอท (Brilliant green lactose bile broth) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

4) อาหารเหลวลอริลทริพโตสบรอท (Lauryl tryptose broth) บริษัท Himedia Laboratories Pvt. Limited ประเทศอินเดีย

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น PB302 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Balance) รุ่น APB104 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3) เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace) รุ่น ELF 10/14 บริษัท Carbolite ประเทศอังกฤษ

4) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Haake DC 10 บริษัท Thermo Haake ประเทศอเมริกา

5) ตู้บ่มแบบเขย่า (Shaking incubator) รุ่น innova 4080 บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศอเมริกา

6) เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น VM-300 บริษัท Scientific Industries ประเทศอเมริกา

7) ตู้แช่เย็น ยี่ห้อ Sanden intercool บริษัท ซันเด้น ประเทศไทย

8) เครื่องย่อยโปรตีน (Digestion system6 1007 digester) บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน

9) เครื่องกลั่นโปรตีน (Distillating unit 1026) บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน

10) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยของอาหาร (Fibertech system M1020 hot and cold extractor) บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน

11) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Soxtech system HT 1043 extraction unit) บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน

12) เครื่องแยกสารชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC) บริษัท Water ประเทศสหรัฐอเมริกา

13) เครื่องวัดเนื้อสัมผัสของอาหาร (Texture analyzer) รุ่น TA.XT plus บริษัท Micro Stable System ประเทศอังกฤษ

14) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) รุ่น HC 502 บริษัท Bibby sterilin ประเทศอังกฤษ

15) ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pumb) รุ่น B-169 บริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

16) เครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (Ultrasonic Sonicator) รุ่น 1875D บริษัท chest ประเทศสิงคโปร์

17) เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น Rotavapor R-124 บริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอแลนด์

18) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น Lambda 25 บริษัท Perkin-Elmer ประเทศเยอรมัน

19) เครื่องวัดสี (Hunter LAB) รุ่น Ultrascan XE บริษัท Hunter associates Laboratory ประเทศอเมริกา

20) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น pH level 1 บริษัท WTW inolab ประเทศเยอรมัน

21) เครื่องวัดคลอรีน (Palintest interface photometer) รุ่น 7000 บริษัท Palintest ประเทศอังกฤษ

22) เครื่องปิดผนึกถุงด้วยสุญญากาศ (Vacuum Sealer) บริษัท Super Vac® ประเทศเยอรมัน

23) เครื่องทำแห้งด้วยลมร้อนแบบถาด (Cabinet Tray Dryer) บริษัทพาสเจอร์ ประเทศไทย

24) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น F240 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

25) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น Hermle Z200A บริษัท Hermle labortechnik ประเทศเยอรมัน

26) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) รุ่น Avanti ™ J-25 บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

27) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BD-53 บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

28) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น ED 115 และ รุ่น F240 บริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

29) หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) รุ่น SS-325 ยี่ห้อ Tomy Seiko ประเทศญี่ปุ่น

30) เครื่องตีปั่นผสม (Stomacher 400 Lab Blender) รุ่น Seward ประเทศอังกฤษ

31) เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

32) เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น MS-2022C บริษัทแอลจี ประเทศจีน

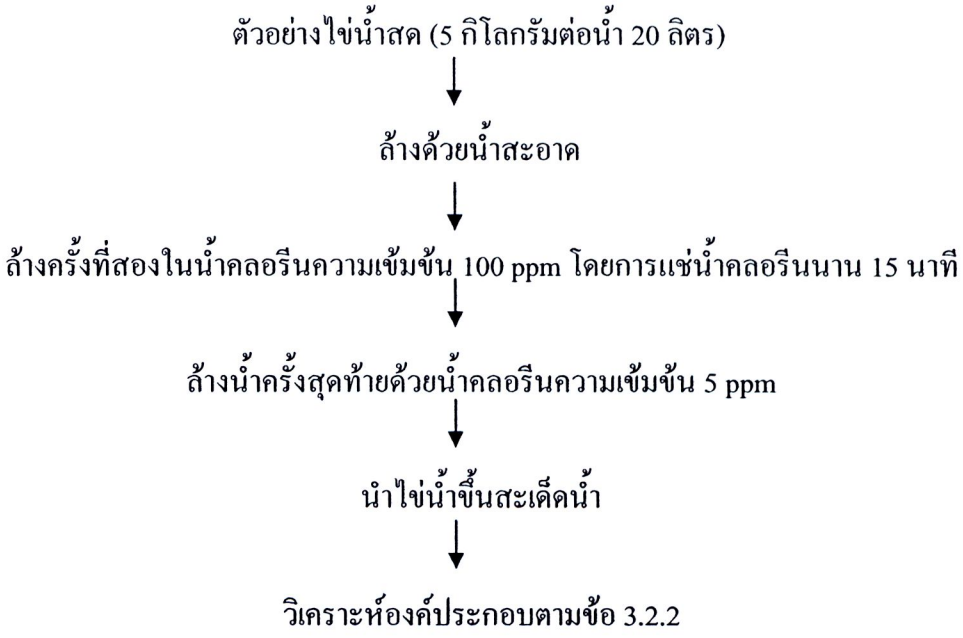
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิทยานิพนธ์ครั้งนี้เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำสด และศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของไข่น้ำในสภาวะการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลและเป็นแนวทางในการขยายการใช้ประโยชน์จากไข่น้ำและเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของการวิจัย จึงมีการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างไข่น้ำ

ไข่น้ำ (*Wolffia arrhiza* (Linn) Wimm) เก็บเกี่ยวช่วงเดือนธันวาคม 2551 ถึงมกราคม 2552 ที่มีสีเขียวสด มีความมันวาว มีความเต่งของเม็ดไข่น้ำ และไข่น้ำมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-1.0 มิลลิเมตร จากตลาดศรีเมืองทอง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด โดยใช้อัตราส่วนไข่น้ำ 5 กิโลกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้การล้างแบบน้ำไหล (running water chamber) ด้วยอัตราเร็วการไหลของน้ำ 5.5 ลิตรต่อนาที ใช้เวลาล้างนานประมาณ 20-30 นาที จากนั้นนำไข่น้ำที่ผ่านการล้างครั้งแรกมาล้างครั้งที่สองในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยการแช่ไข่น้ำไว้ให้สัมผัสกับน้ำคลอรีนนาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (*ca.*28±2°ซ) และล้างน้ำครั้งสุดท้ายด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 5 ppm (Allenda and others 2008) นำไข่น้ำขึ้นมาสะเด็ดน้ำแล้ววัดปริมาณคลอรีนที่ตกค้างไม่เกิน 2 ppm (มอก 928, 2533) การเตรียมตัวอย่างไข่น้ำแสดงในภาพที่ 17 นำตัวอย่างไข่น้ำไปวิเคราะห์องค์ประกอบตามข้อ 3.2.2



ภาพที่ 17 การเตรียมตัวอย่างไข่น้ำ

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำสด

นำไข่น้ำสดจากข้อ 3.2.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้

- ความชื้น (AOAC 1999)
- ปริมาณโปรตีน (AOAC 1999)
- ปริมาณไขมัน (AOAC 1999)
- ปริมาณเถ้า (AOAC 1999)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Sogi and others 2002)
- ปริมาณไรโบฟลาวิน (ดัดแปลงจาก Tang and others 2006)
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Simon and Helliwell 1998)
- ปริมาณเบต้าแคโรทีน (AOAC 1995 อ้างถึงใน Cyanotech Corparation 2002)
- ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด (Singleton and Rossi 1965)
- กิจกรรมในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก กันยนา กรณ์เกษม 2548)

- ปริมาณเส้นใย
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำไม่ได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยทั้งหมด (AOAC 1999)
- ค่าสีในระบบ CIE (L*, a*, b*) โดยใช้เครื่อง Hunter LAB รุ่น Ultra Scan XE
- ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส TA-XT2 Plus ใช้หัววัดแบบ back extrusion (Bourne 2002)
- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคลิฟอร์ม (Allenda and others 2008)

3.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อองค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำสดในระหว่างการเก็บรักษา

เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญบางประการในระหว่างการเก็บรักษาของไข่น้ำหลังการเก็บเกี่ยว มีปัจจัยที่ศึกษาคือ อุณหภูมิในการเก็บรักษา 3 ระดับ (อุณหภูมิห้อง (*ca.*28±2°ซ), 10°ซ และ 4°ซ) (Ferrante and Maggiore 2007) เปรียบเทียบกับตัวอย่างไข่น้ำสด

นำตัวอย่างไข่น้ำจากข้อ 3.2.1 ทำการบรรจุตัวอย่างไข่น้ำสด น้ำหนัก 150 กรัม ลงในถุงพอลิโพรพิลีนแล้วปิดผนึกด้วยความร้อน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28, 10 และ 4°ซ สุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10,12, 14 และ 16 วัน ตัวอย่างไข่น้ำทำการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ ต่อไปนี้

- ความชื้น (AOAC 1999)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Sogi and others 2002)
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Simon and Helliwell 1998)
- ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด (Singleton and Rossi 1965)
- กิจกรรมในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก กันยนา กรณ์เกษม 2548)
- ปริมาณเส้นใย
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำไม่ได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยทั้งหมด (AOAC 1999)

- ค่าสีในระบบ CIE (L*, a*, b*) โดยใช้เครื่อง Hunter LAB รุ่น Ultra Scan XE
- ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส TA-XT2 Plus ใช้หัววัดแบบ back extrusion (Bourne 2002)
- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคลิฟอร์ม (Allenda and others 2008)

วางแผนการทดลองแบบ split- plot in CRD system โดยกำหนดให้ main plot คือ วันที่ตัวอย่างถูกสุ่มออกมาตรวจวิเคราะห์ และ sub-plot คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาไข่น้ำ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูล (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 17

3.2.4 การศึกษาผลของกระบวนการทำแห้งและการแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางกายภาพ เคมี และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำ

โดยทำการศึกษาผลของกระบวนการทำแห้งและการแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำหลังการเก็บเกี่ยว ดังต่อไปนี้

3.2.4.1 การทำแห้งแบบถาดด้วยลมร้อน (tray dryers) นำตัวอย่างไข่น้ำจากข้อ 3.2.1 มาผ่านการทำแห้งแบบถาดด้วยลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 5 ชม. จนกระทั่งมีความชื้นร้อยละ 6±2 (ชาญวิทย์ รัตนราศรี 2547) บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °ซ ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างเซลล์ตัวอย่างไข่น้ำแห้งจะถูกนำมาคืนรูปก่อน โดยนำตัวอย่างไข่น้ำแห้ง 3 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 50°ซ นาน 30 นาที (วิชญวดี ศรีนุเคราะห์ 2550)

3.2.4.2 การแช่แข็งด้วยลมเย็นแบบเป่าลม (air blast freezer) นำตัวอย่างไข่น้ำจากข้อ 3.2.1 มาผ่านการแช่เยือกแข็งด้วยลมเย็นแบบเป่าลม ที่อุณหภูมิ -37°ซ นาน 3 ชม. (Bunea and others 2008) จนกระทั่งอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางเป็น -18 °ซ แล้วบรรจุน้ำหนัก 300 กรัม ต่อถุง ใส่ถุงพอลิเอทิลีนแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°ซ

นำตัวอย่างไข่น้ำที่ผ่านการทำแห้ง (ข้อ 3.2.4.1) และการแช่เยือกแข็ง (ข้อ 3.2.4.2) มาวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมี กายภาพ และปริมาณจุลินทรีย์ โดยตัวอย่างไข่น้ำแช่เยือกแข็งต้องผ่านการละลายน้ำแข็ง โดยนำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (วิไล รังสาดทอง 2545) ก่อนทำการวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับคุณลักษณะของไข่น้ำสด ดังนี้

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (Sogi and others 2002)
- ปริมาณไรโบฟลาวิน (ดัดแปลงจาก Tang and others 2006)
- ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Simon and Helliwell 1998)
- ปริมาณเบต้าแคโรทีน (AOAC 1995 อ้างถึงใน Cyanotech Corparation 2002)
- ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด (Singleton and others 1965)
- กิจกรรมในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก กันยนา กรณ์เกษม 2548)
- ปริมาณเส้นใย
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยที่ละลายน้ำไม่ได้ (AOAC 1999)
  - ปริมาณเส้นใยทั้งหมด (AOAC 1999)
- ค่าสีในระบบ CIE (L*, a*, b*) โดยใช้เครื่อง Hunter LAB รุ่น Ultra Scan XE
- ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยใช้เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส TA-XT2 Plus ใช้หัววัดแบบ back extrusion (Bourne 2002)
- ลักษณะโครงสร้างของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 10 เท่า) (Wang and others 2008)
- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและโคลิฟอร์ม (Allenda and others 2008)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomize Design; CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 17

3.3 สถานที่ทำการทดลองวิจัย

ห้องปฏิบัติการเคมีอาหารและกายภาพ ห้องปฏิบัติการแปรรูป ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น