บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ขวด Duran ปากกว้าง ขนาด 1,000 ml

1.2 ขวด Duran ขนาด 250 ml

1.3 ขวด Duran ขนาด 500 ml

1.4 หม้อต้มขนาด 20 ลิตร

1.5 ไม้พาย

1.6 บิวเรตต์

1.7 ฟลาสก์รูปชมพู่ (Erlenmyer flask)

1.8 น้ำมะพร้าวแก่

1.9 น้ำเวย์เต้าหู้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก โรงงานคุณประเสริฐอุตสาหกรรมอาหาร

2. เครื่องมือ

2.1 pH Meter (Metrohm®, 713 pH Meter)

2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Adam®, ABC-1000)

2.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, AB304-5)

2.4 เครื่อง Autoclave (Tomy® SX-700)

2.5 เครื่องบดอาหาร (Moulinex®, DPA141)

3. สารเคมี

3.1 น้ำตาล (มิตรผล)

3.2 $(NH_4)_2SO_4$ (แอมโมเนียม ซัลเฟต) (Analytical grade, Merck®, Germany)

3.3 Glacial acetic acid (Analytical grade, Prolabo®, England)

3.4 NaOH (Analytical grade, Prolabo®, England)

3.5 Phenolpthalene (Analytical grade, Merck®, Germany)

4. วิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 ตรวจสอบคุณภาพน้ำเวย์เต้าหู้

เก็บตัวอย่างน้ำเวย์จากขั้นตอนการตกตะกอนน้ำเต้าหู้ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ ส่งวิเคราะห์ที่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด โดยวิเคราะห์ถึงปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส แลคโตส และซูโครส ในน้ำเวย์เต้าหู้ โดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ด้วยวิธี Kjeldahl Method และค่า pH ของน้ำเวย์เต้าหู้ นำน้ำเวย์มาวัดโดยใช้เครื่อง pH Meter (Metrohm,713 pH Meter) บันทึกผล

4.2 เตรียม Stock Culture สำหรับใช้ในการทดลอง

นำเชื้อ *Acetobacter xylinum* Agr 60 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในรูปแบบของเชื้อในน้ำมะพร้าว นำหัวเชื้อที่ได้ ถ่ายลงในอาหาร Coconut Water Medium (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน เก็บหัวเชื้อที่ได้ไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้

4.3 การศึกษาอายุ และปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลส จาก *Acetobacter xylinum* Agr 60 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเวย์เต้าหู้

1. เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น *Acetobacter xylinum* Agr 60 เช่นเดียวกับข้อ 4.2 เป็นจำนวน 3 ชุด โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7, 10, 14 วันตามลำดับ

2. เตรียมน้ำเวย์ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดัดแปลงจากปราโมทย์ และคณะ, 2547) เติมน้ำตาล 5% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ต้มน้ำเวย์ให้เดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที บรรจุขณะร้อน ปริมาตร 700 ml ลงในขวด Duran ปากกว้าง ขนาด 1,000 ml ทิ้งไว้จนเย็น

3. นำเชื้อตั้งต้น ที่อายุเชื้อต่างๆ มาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 5%, 7% และ 10% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองแต่ละการทดลอง 3 ซ้ำ เลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 14 วัน ตรวจวัดความหนาของเซลลูโลสทุกวัน และชั่งน้ำหนักเซลลูโลส บันทึกผลที่ได้ และวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม SPSS ver.15 for Window Evaluation version

4.4 ปริมาณน้ำตาล และ pH ที่เหมาะสม ในการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* Agr 60 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเวย์เต้าหู้

4.4.1 ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส

1. การหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* Agr 60 นั้น วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ผันแปรปริมาณซูโครสที่ระดับ 0% 5%, 10% และ 15% โดยเติมซูโครสลงไปในขณะต้มฆ่าเชื้อน้ำเวย์ พร้อมกับการเติม 0.5% แอมโมเนียมซัลเฟต บรรจุขวดขณะร้อน ปริมาตร 700 ml ในขวดดูแรนขนาด 1,000 ml ทิ้งไว้จนเย็น จากนั้นเติมหัวเชื้อ *A. xylinum* Agr 60 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเวย์เต้าหู้อายุ 10 วัน ปริมาณ 5% ของปริมาตรอาหารน้ำเวย์ เลี้ยงเชื้อที่สภาวะนิ่ง (Static culture) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน บันทึกความหนาของเซลลูโลสทุกๆวัน จนจบการทดลอง ชั่งน้ำหนักเซลลูโลสที่ได้ และวัดปริมาณกรดและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS ver.15 for Window Evaluation version

4.4.2 pH ที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลส

1. การหาช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลลูโลสจาก *Acetobacter xylinum* Agr 60 จะวางแผนการทดลองแบบ CRD ได้ผันแปรระดับของ pH ไว้ทั้งหมด 4 ระดับ ได้แก่ 4, 5, 6 และ 7 โดยปรับ pH ด้วย Glacial Acetic Acid และ 5M NaOH เมื่อปรับ pH น้ำเวย์ตามแผนการทดลองที่ต้องการแล้ว นำน้ำเวย์ไปต้มเดือดฆ่าเชื้อเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณตามผลการทดลองที่ได้ใน 4.4.1 และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% แล้วบรรจุร้อน ปริมาตร 700 ml ลงขวดดูแรนปากกว้างขนาด 1,000 ml ที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้จนเย็น แล้วเติมหัวเชื้ออายุ 10 วัน ปริมาณ 5% ลงไป เพาะเลี้ยงในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 14 วัน สังเกตความหนาของเซลลูโลสทุกวันจนถึงวันที่ 14 จากนั้นวัดความหนาของแผ่นเซลลูโลส ณ วันสุดท้าย ชั่งน้ำหนักของเซลลูโลสที่ได้ ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ และ pH สุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS ver.15 for Window Evaluation version

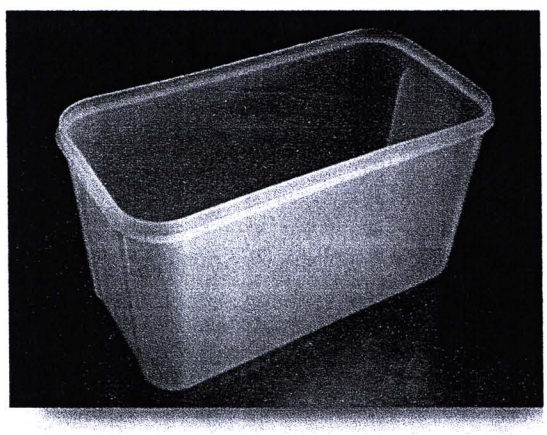
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุด

4.5 ภาชนะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* Agr 60 ที่เพาะเลี้ยงในน้ำเวย์เต้าหู้

1. ในการผลิตเซลลูโลสแบคทีเรียเพื่อการค้า ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลลูโลสเป็นสิ่งสำคัญในการทดลอง โดยเพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกที่มีพื้นที่หน้าตัดกล่อง แตกต่างกัน วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลสแบคทีเรียจาก *Acetobacter xylinum* Agr 60 ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 มิติ (กว้าง x ยาว) ของภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง คือ 13x27 cm และ 18x24 cm

ปัจจัยที่ 2 ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับ 6 cm (½ ของความสูงภาชนะ) และ 10 cm (¾ ของความสูงภาชนะ)



ภาพ 3 กล่องพลาสติกขนาด 13x27 cm

ภาพ 4 กล่องพลาสติกขนาด 18x24 cm

2. กล่องใหม่ที่นำมาใช้เลี้ยงเชื้อ นำมาแช่สารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 500 ppm เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อฆ่าเชื้อราที่อาจติดอยู่ที่กล่องพลาสติก ล้างน้ำสะอาดอีกครั้ง ลวกกล่องด้วยน้ำร้อน ก่อนนำมาเลี้ยงเชื้อต่อไป

3. เลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* Agr 60 ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่เติมน้ำตาลซูโครส และ pH ตามผลการทดลองที่ได้ และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% ฆ่าเชื้อด้วยการต้มเดือด เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วบรรจุลงในกล่องพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วขณะร้อน เมื่อน้ำเวย์ในถังพลาสติกเย็นตัวลง จึงเติมหัวเชื้อ

อายุ 10 วันปริมาตร 5% ของปริมาตรน้ำเวย์ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน วัดความหนาของแผ่นเซลลูโลสทุกวันจนครบ 14 วัน แล้วจึงชั่งน้ำหนักเซลลูโลส เพื่อหาปริมาตรของเซลลูโลสที่ได้

4. วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม SPSS ver.15 for Window Evaluation version

4.6 การประยุกต์ใช้เซลลูโลสแบคทีเรีย

4.6.1 การอบแห้งเซลลูโลส

นำเซลลูโลสที่ได้จากการทดลองมาอบ โดย การอบลมร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และอบแห้งแบบแช่เย็ง (Freeze drying) จนตัวอย่างแห้ง เตรียมตัวอย่างที่ใช้ทดลอง 2 ลักษณะ คือ ตัวอย่างเซลลูโลสแบบชิ้น ล้างและแช่ชิ้นเซลลูโลสที่ได้ในน้ำเปล่า 4 ชั่วโมง หั่นเซลลูโลสที่ได้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมผืนผ้า นำไปต้มเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลลูโลสที่ได้มีสีขาว และเซลลูโลสบดละเอียดโดยบดเซลลูโลสด้วยเครื่องบดอาหารเป็นระยะเวลา 1 นาที ชั่งน้ำหนักเซลลูโลสอบแห้งที่ได้ ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เมื่อได้ผลิตภัณฑ์เซลลูโลสอบแห้ง ทดสอบการคืนตัวของตัวอย่างเซลลูโลสแห้งที่ได้ โดยการแช่ตัวอย่างในน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำออกจากตัวอย่าง จนแน่ใจว่าไม่มีน้ำออกมาจากตัวอย่าง ชั่งน้ำหนัก ก่อนและหลังแช่น้ำด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง คำนวณ % Rehydration ที่ได้ ตามสูตร

$$\%\ Rehydration = \frac{\text{น้ำหนักของเซลลูโลสหลังแช่น้ำ}}{\text{น้ำหนักของเซลลูโลสแห้ง}} \times 100$$

4.6.2 การประยุกต์ใช้เซลลูโลสแบคทีเรีย เพื่อปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัมผัสข้าว

4.6.2.1 การหาปริมาณเซลลูโลสเพื่อการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัมผัสของข้าว

ในการนำเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ โดยการเติมเซลลูโลสบดละเอียดลงไปในข้าว เพื่อลดความแข็งของข้าวนั้น ได้ศึกษาปริมาณเซลลูโลสที่เหมาะสมกับข้าว 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวพิจิตรแข็ง ข้าวหอมมะลิสีนิล และข้าวกล้องดอย โดยเติมเซลลูโลสบดละเอียด ในอัตราส่วน ข้าว: เซลลูโลส ที่ 1:0.1, 1:0.5, 1:1 และ 1:2 โดยน้ำหนัก เติมน้ำลงไปสองเท่าของน้ำหนักข้าว นึ่งข้าวเป็นเวลา 30 นาที บันทึกลักษณะข้าวสวยที่ได้ และเลือกช่วงปริมาณเซลลูโลสที่เหมาะสม เพื่อศึกษากับผู้บริโภคต่อไป

4.6.2.2 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค ที่มีต่อข้าวปรับปรุงคุณภาพด้วยเซลลูโลส

ศึกษาการเติมเซลลูโลสลงไปในข้าวก่ำดอย 2 ช่วงปริมาณเซลลูโลส คือ อัตราส่วนข้าว: เซลลูโลสที่ 1:0.075 และ1:0.1 และทดสอบชิมโดยใช้ข้าวที่ไม่ได้เติมเซลลูโลส เป็นตัวอย่างควบคุม สุ่มเลขรหัสของข้าวทั้งสาม หมายเลขตัวอย่างข้าวด้วยตัวเลข 3 หลัก เสิร์ฟตัวอย่างข้าวทั้งสาม ในถ้วยพลาสติกสีขาว จัดเสิร์ฟแบบสุ่ม โดยศึกษาถึงคุณลักษณะของข้าวดังนี้ ลักษณะของข้าวที่ปรากฏ, ความนุ่มของข้าว, ความเป็นเนื้อเดียวกันของข้าวกับเซลลูโลส, สมบัติเซลลูโลสหลังกลืนข้าว, ความชอบโดยรวม ให้คะแนนตัวอย่างโดยการให้คะแนนแบบ 5-Point Hedonic Scale ทดสอบชิมกับผู้บริโภคทั่วไป ซึ่งเป็นนักศึกษา สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 50 คน วิเคราะห์คะแนนความชอบที่ได้ โดยแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ด้วยโปรแกรม SPSS ver.15 for Window Evaluation version