

วิธีการทดลอง

กรอบการวิจัยในโครงการวิจัย เรื่อง สมบัติเชิงหน้าที่ของไคตินและไคโตแซนต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำโดยไม่ใช้ความร้อน

แนวคิดและเป้าหมายของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาปัจจัยการผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำโดยกระบวนการทางเคมีภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ความร้อน เนื่องจากเป็นกระบวนการที่สามารถประหยัดพลังงานได้ มากแม้ว่าจะใช้เวลานานกว่า และผลผลิตที่ได้คาดว่าจะมีสมบัติทางเคมีและเชิงหน้าที่แตกต่างจากวิธีใช้ความร้อนเพราะได้รับผลกระทบจากความร้อนไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังรวมถึงการศึกษาสมบัติทางเคมีและเชิงหน้าที่บางประการที่สำคัญของไคโตแซนที่ผลิตได้ และผลต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์มายองเนส โดยแบ่งหัวข้อการศึกษา ดังนี้

1.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตไคตินและไคโตแซนโดยไม่ใช้ความร้อน

1.2 การศึกษาผลของไคโตแซนที่ผลิตโดยไม่ใช้ความร้อนต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์มายองเนส

1.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตไคตินและไคโตแซนโดยไม่ใช้ความร้อน

การผลิตไคตินและไคโตแซนโดยไม่ใช้ความร้อน เป็นกระบวนการที่สามารถประหยัดพลังงานได้มาก แม้ว่าจะใช้เวลานานมากกว่า และยังไม่พบการรายงานสภาวะการผลิตที่เหมาะสมจากเปลือกกุ้งกุลาดำ จึงได้ทำการ ศึกษาสภาวะการผลิตดังนี้

(1) การกำจัดโปรตีน (Deproteinization)

นำเปลือกกุ้งกุลาดำสด (เฉพาะส่วนเปลือกลำตัว) มาล้างทำความสะอาด และทำให้สะอาดด้วยน้ำด้วยการหมუნเหวี่ยง แล้วนำมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4.0, 6.0 และ 8.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เท่ากับ 1:6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ล้างล้างออกให้มีสภาพเป็นกลางแล้วทำให้สะอาดน้ำ เพื่อนำไปกำจัดเกลือแร่ (Demineralization) ในขั้นตอนต่อไป สุ่มตัวอย่างเปลือกกุ้งที่กำจัดโปรตีนแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี AOAC (1999) วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกสภาวะในการกำจัดโปรตีนที่เหมาะสมโดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนสูงสุด โดยการคำนวณเทียบจากปริมาณโปรตีนเริ่มต้นที่มีในเปลือกกุ้ง

(2) การกำจัดเกลือแร่ (Demineralization)

นำเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีน ภายใต้สภาวะที่คัดเลือกแล้วจากข้อ (1) มาล้างและทำให้สะอาดแล้วแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 6 และ 8 (น้ำหนัก / ปริมาตร) ในอัตราส่วนของเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีนต่อสารละลายกรด เท่ากับ 1:6 (น้ำหนัก / ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดเกลือแร่ มาล้างด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง และ

ทำให้สะอาดแล้วนำไปทำแห้งและเก็บในภาชนะปิดมิดชิด วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกสภาวะการกำจัดเกลือแร่ที่เหมาะสมที่สุด (โดยการเทียบจากปริมาณเถ้าเริ่มต้นที่มีในเปลือกกุ้ง) สุ่มตัวอย่างไคตินที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ปริมาณเถ้า โปรตีน และความชื้น ด้วยวิธี AOAC (1999) ไคตินทั้งหมด (Total crude chitin) ด้วยวิธีของ Shahidi และ Synowiecki, (1991) และการละลายของไคตินโดยใช้ตัวทำละลาย N,N dimethylacetamide (DMAc – 5% LiCl) ตามวิธีของ Rutherford และ Austin (1978)

(3) การกำจัดหมู่อะซิติล (Deacetylation)

นำไคตินที่ผลิตจากสภาวะเหมาะสมที่คัดเลือกจากข้อ (1) และ (2) มากำจัดหมู่อะซิติลโดยการประยุกต์วิธีของ Alimunair และ Zainuddin (1992) ด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 อัตราส่วนไคตินต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1:10 (นน. / ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน หลังจากนั้นนำมาล้างให้เป็นกลาง แล้วนำมาทำแห้งและเก็บรักษาในภาชนะที่ปิดมิดชิด สุ่มตัวอย่างไคโตแซนที่ได้นำมาตรวจวัดระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation of chitosan) โดยผลิตฟิล์มไคโตแซนแล้วนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 1650 cm^{-1} และ 3450 cm^{-1} โดยเครื่อง FTIR spectrometer (Baxter *et al.*, 1992) น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี viscometric molecular mass (Roberts and Domszy, 1982) ความหนืด (ในสารละลายกรดอะซิติก 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร)) (Bough *et al.*, 1978) ค่าสมดุลของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ชอบไขมัน (hydrophilic lipophilic balance, HLB) ตามวิธีของ Rodriquez และคณะ (2002) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion activity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) คัดแปลงจากวิธีของ Ogawa และคณะ (2003) และ oil droplet size distribution ตามวิธีของ Ma และ Barbosa-Cánovas (1995)

1.2 การศึกษาผลของไคโตแซนที่ผลิตโดยไม่ใช้ความร้อนต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์มายองเนส

การศึกษาผลของไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกลาดำภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ความร้อนเป็นเวลา 8 วัน ที่มีต่อสมบัติด้านการไหล หรือรีโอโลยีของผลิตภัณฑ์มายองเนส เปรียบเทียบกับการใช้สารแซนแทนกัม (xanthan gum) ตามวิธีของ Ma และ Barbosa-Cánovas (1995) โดยใช้ไคโตแซนในปริมาณร้อยละ 0.1, 0.2, 0.3, และ สารแซนแทนกัมในปริมาณร้อยละ 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 โดยน้ำหนักทั้งหมด เติมลงในผลิตภัณฑ์มายองเนสแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 20°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนทำการตรวจวัดคุณลักษณะการไหลของมายองเนสด้วยเครื่อง Texture Analyser ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA-XT2i หาค่า storage modulus, loss modulus, apparent viscosity, yield stress, creep และ creep recovery, pH, density, oil droplet size distribution ตามวิธีของ Ma และ Barbosa-Cánovas (1995)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างระหว่างชุดทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนที่ผลิตโดยไม่ใช้ความร้อนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน

แนวคิดและเป้าหมายของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาผลของไคโตแซนที่ผลิตจากเปลือกกุ้งกุลาค่าภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้ความร้อนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน เพื่อนำไปสู่แนวทางการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยแบ่งหัวข้อการศึกษา ดังนี้

- 2.1 การผลิตไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน
- 2.2 การศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน

2.1 การผลิตไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน

นำไคโตแซนที่ผ่านการกำจัดหมู่อะซิติกแบบไม่ใช้ความร้อน เป็นระยะเวลา 10 วัน มาผ่านการกำจัดหมู่อะซิติกซ้ำอีกครั้ง โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาแตกต่างกันคือ 1 2 และ 3 ชั่วโมง นำผลผลิตที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก โดยผลิตฟิล์มไคโตแซนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 1650 cm^{-1} และ 3450 cm^{-1} โดยเครื่อง FTIR spectrometer (Baxter *et al.*, 1992) คัดเลือกสภาวะในการไฮโดรไลส์ไคโตแซนเพื่อให้ได้ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 75-80, ร้อยละ 81-85 และร้อยละ 86-90

หลังจากนั้นใช้ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 75-80 มาเป็นตัวแทนของไคโตแซนกลุ่มอื่นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลส์หมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล อัตราส่วนระหว่างไคโตแซนต่อสารละลายกรดไฮโดรคลอริก คือ 1 :10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 และ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านการล้างด้วยน้ำจนมีสภาพเป็นกลางแล้วอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง นำไคโตแซนที่ผ่านการไฮโดรไลส์มาวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี Viscometric molecular mass (Robert and Domszy, 1982) วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (2x2) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง คัดเลือกสภาวะที่ใช้ในการไฮโดรไลส์ เพื่อให้ได้ไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (Lin and Chao, 2001)

- low molecular weight (100-500 กิโลดาลตัน)
- medium molecular weight (600-1000 กิโลดาลตัน)
- high molecular weight (1100-1500 กิโลดาลตัน)

หลังจากคัดเลือกสภาวะในการไฮโดรไลส์ไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติก และน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการผลิตไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจากไคโตแซนที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 75-80, 81-85 และ 86-90 ทำให้ได้ไคโตแซนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง แสดงดังตารางที่ 3 ทำการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของไคโตแซนทั้งหมด ประกอบ

1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยนำไคโตแซนละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลายไคโตแซนมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดความหนืดโดยใช้ Brookfield Viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

2) ค่าความสามารถในการจับน้ำ (water binding capacity) และความสามารถในการจับไขมัน (fat binding capacity) ของไคโตแซน โดยนำไคโตแซน 0.5 กรัม ผสมกับน้ำหรือไขมัน 10 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปผ่านเครื่องเหวี่ยงแยก หาปริมาณน้ำหรือไขมันที่จับกับไคโตแซน ตามวิธีของ No และคณะ (2000)

3) ค่าสมดุลของหมู่ที่ชอบน้ำกับหมู่ที่ชอบไขมัน (hydrophilic lipophilic balance, HLB) โดยหาค่า HLB จากสมการของกราฟมาตรฐาน ตามวิธีของ Rodriguez และคณะ (2002)

ตารางที่ 3 ลักษณะของไคโตแซนจากเปลือกกุ้งกุลาดำที่ผ่านการไฮโดรไลส์เพื่อใช้ในการทดลอง

Chitosan sample	Degree of deacetylation (%)	Molecular weight (KDa)
1	75-80	100-500
2	75-80	600-1000
3	75-80	1100-1500
4	81-85	100-500
5	81-85	600-1000
6	81-85	1100-1500
7	86-90	100-500
8	86-90	600-1000
9	86-90	1100-1500

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

2.2 การศึกษาผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน

(1) ผลของไคโตแซนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน

ศึกษาผลของไคโตแซนที่ใช้ในการผลิตอิมัลชันต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน โดยเลือกใช้ไคโตแซนจากตารางที่ 3 (ตัวอย่างที่ 3) ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกร้อยละ 75-80 และมีน้ำหนักโมเลกุล 1100-1500 กิโลดาลตัน เป็นตัวแทน โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

- 1) ความเข้มข้นของไคโตแซนร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 2) อัตราส่วนระหว่างสารละลายไคโตแซนต่อน้ำมันพืช 9:1 8:2 7:3 และ 6:4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (4x4) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

ทำการเตรียมอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jumaa และ Muller (1999) โดยนำโคโคแซนมาละลายในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับความเข้มข้นของโคโคแซนร้อยละ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนผสมด้วยเครื่องกวน (Magnetic stirrer) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายโคโคแซนผสมกับน้ำมันพืชในอัตราส่วน 9:1 8:2 7:3 และ 6:4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปั่นผสมโดยใช้ homogenizer รุ่น Ultra-Turrax T25B ที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 นาที แล้ววิเคราะห์สมบัติของอิมัลชันประกอบด้วย

- 1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้ Brookfield viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)
- 2) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion capacity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) ดัดแปลงจากวิธีของ Ogawa และคณะ (2003)

คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอิมัลชันจากตัวอย่างอิมัลชันที่มีค่าความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด เพื่อใช้เป็นสภาวะในการเตรียมอิมัลชันในการทดลองข้อ (2.2) ต่อไป

(2) ผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของโคโคแซนต่อสมบัติของระบบอิมัลชัน

นำโคโคแซนจากตารางที่ 3 ซึ่งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมาใช้ในการผลิตอิมัลชันภายใต้สภาวะที่คัดเลือกจากข้อ (2.1) แล้ววิเคราะห์สมบัติของอิมัลชัน ประกอบด้วย

- 1) ค่าความหนืด (viscosity) โดยใช้ Brookfield viscometer ตามวิธีของ No และคณะ (2000)
- 2) ค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion capacity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) ดัดแปลงจากวิธีของ Ogawa และคณะ (2003)

เปรียบเทียบผลของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลของโคโคแซนต่อสมบัติการเกิดอิมัลชัน คัดเลือกตัวอย่างที่มีความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของเม็ดไขมัน โดยวิธี Laser Scanning Confocal Microscope (Srinivasan *et al.*, 2001) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง

การทดลองที่ 3 การดัดแปรไคตินให้เป็นไคตินรูปผลึกขนาดเล็ก (Microcrystalline Chitin : M-Chitin)

แนวคิดและเป้าหมายของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาการดัดแปรไคตินให้เป็นไคตินรูปผลึกขนาดเล็ก และตรวจวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของสารอนุพันธ์ไคตินดังกล่าว ประเด็นการศึกษาประกอบด้วย

3.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตไคตินรูปผลึกขนาดเล็ก

3.2 การศึกษาผลของไคตินรูปผลึกขนาดเล็กต่อสมบัติของอิมัลชัน

3.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตไคตินรูปผลึกขนาดเล็ก

(1) การเตรียมไคติน

นำเปลือกกุ้งกุลาดำสด (เปลือกส่วนลำตัว) ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดและทำให้สะอาดแล้ว นำมาแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยการใช้อัตราส่วนเปลือก กุ้งต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1 ต่อ 6 (กรัม / มิลลิลิตร) แช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) แล้วทำให้สะอาด นำเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีน มาแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้อัตราส่วน ของเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดโปรตีน ต่อสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1 ต่อ 6 (กรัม/มิลลิลิตร) แช่ไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมากรองและล้างด้วยน้ำให้มีสภาพเป็นกลาง ทำให้แห้ง นำไปวิเคราะห์ ปริมาณความชื้น โปรตีน และเถ้า (AOAC, 1999) และปริมาณไคตินทั้งหมด (Shahidi and Synowiecki , 1991)

(2) การเตรียมไคตินรูปผลึกขนาดเล็กที่สภาวะต่างๆ

นำไคตินจากข้อ (1) มาทำเป็นไคตินในรูปผลึกขนาดเล็ก (Microcrystalline chitin: MCC) ด้วยการ ใช้ไคตินที่อบแห้งจำนวน 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่มีสารละลายกรดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส พร้อมกับการคนตลอดเวลา เป็นเวลาตามที่กำหนด หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที จนตกตะกอน เทของเหลวส่วนใสออก นำของแข็งที่ได้ล้างด้วยน้ำร้อน แล้วเติมน้ำกลั่นร้อยละ 10 ของ น้ำหนักตัวอย่าง นำมาปั่นด้วยเครื่อง milling (Heidolph DIAX 900 with tool 30DF) เป็นเวลา 5 นาที และนำมา หมุนเหวี่ยงแยก MCC แล้วทำให้แห้งโดยวิธี Freeze drying จนเหลือความชื้นร้อยละ 5-6 สภาวะต่างๆที่ศึกษา ดังนี้

- ชนิดและความเข้มข้นของกรด
 - กรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
 - กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
 - กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- เวลาในการทำปฏิกิริยาการย่อยสลาย (hydrolysis) ที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง
 - นำตัวอย่างไคตินรูปผลึกขนาดเล็กที่ได้ ไปวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมี ได้แก่
 - น้ำหนักโมเลกุล (MW) โดยวิธี Viscometric molecular mass (Robert and Domszy, 1982)
 - ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (%DD) ด้วยเครื่อง FTIR spectrometer (Baxter *et al.*, 1992)
 - Emulsification Capacity and Emulsion Stability (Holm and Eriksen, 1980)
 - Oil droplet size distribution (Rodriquez *et al.*, 2002)

ออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล ประเมินผลของแต่ละปัจจัยที่ศึกษาต่อสมบัติของไคตินในรูปผลึกขนาดเล็กเปรียบเทียบกับไคตินเริ่มต้น วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) เลือกสภาวะในการผลิต MCC ที่มีสมบัติด้านอิมัลชันที่ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การศึกษาผลของของไคตินรูปผลึกขนาดเล็กที่มีต่อสมบัติของอิมัลชัน

(1) การเตรียมมายองเนส

ใช้ส่วนผสมสูตรมายองเนส ดัดแปลงจากวิธีของ Ma และ Babosa-Canovas (1995) ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันพืช 187.5 กรัม สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 20 จำนวน 4 กรัม ไข่แดง 8 กรัม น้ำตาล 4 กรัม เกลือ 2 กรัม น้ำ 65 กรัม วิธีการผสมเริ่มด้วยการตีไข่แดง น้ำตาล เกลือและอื่นๆในชามผสมด้วยเครื่อง homogenizer (Heidolph DIAX 900 with homogenizer tool 30DF) ที่ความเร็ว 9500 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วค่อยๆเติมน้ำมัน ตีจนกระทั่งน้ำมันกลายเป็นหยดเล็กๆเข้ากับน้ำ แล้วจึงเติมน้ำส้มสายชู ขณะตีส่วนผสมอย่างต่อเนื่องให้เติมน้ำมันและน้ำส้มสายชูไปจนหมด จากนั้นเปลี่ยนระดับความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมายองเนสที่ได้ถ่ายลงในภาชนะและเก็บรักษาที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการวัดคุณลักษณะการไหลของมายองเนสต่อไป

(2) ผลของปริมาณไคตินรูปผลึกขนาดเล็กต่อลักษณะการไหลของมายองเนส

เลือกไคตินรูปผลึกขนาดเล็กที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอิมัลชันที่ดีที่สุดมาผสมในผลิตภัณฑ์มายองเนส ปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 ของน้ำหนักทั้งหมด เปรียบเทียบกับการใช้สารแซนแทนกัม (xanthan gum) เตรียมผลิตภัณฑ์มายองเนสตามข้อ (1) และตรวจวัด

- คุณลักษณะการไหลของมายองเนสด้วยเครื่อง Texture Analyser ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น A-XT2i โดยตรวจวัดค่า storage modulus, loss modulus, apparent viscosity, yield stress, creep และ creep recovery ตามวิธีของ Ma และ Barbosa-Canovas (1995)
- ค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช
- ค่าความหนาแน่น (Density)
- Oil droplet size distribution (Rodriguez *et al.*, 2002)

ทำการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะโดยรวม โดยทำการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (RCBD) ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

การทดลองที่ 4 การดัดแปรไคโตแซนให้เป็นการ์บอกรีเมทิลไคโตแซน

(Carboxymethyl Chitosan : CM-Chitosan)

แนวคิดและเป้าหมายของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาปัจจัยการผลิตที่เหมาะสมต่อการดัดแปรไคโตแซนที่ผลิตโดยกระบวนการไม่ใช้ความร้อน ให้เป็นสารอนุพันธ์ชนิดคาร์บอกรีเมทิลไคโตแซน ซึ่งคาดว่าจะสามารถปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของไคโตแซนได้ โดยแบ่งหัวข้อของการศึกษา ดังนี้

- 4.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตคาร์บอกรีเมทิลไคโตแซน
- 4.2 การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของคาร์บอกรีเมทิลไคโตแซน ในผลิตภัณฑ์มาของเนส

4.1 การศึกษาปัจจัยการผลิตคาร์บอกรีเมทิลไคโตแซน (Carboxymethyl Chitosan : CM-Chitosan)

ผลิตคาร์บอกรีเมทิลไคโตแซน โดยประยุกต์จากวิธีการของ Chen และคณะ (2003) โดยใช้ไคโตแซนผงที่ผลิตจากเปลือกกุ้งกุลาดำโดยวิธีไม่ใช้ความร้อน จำนวน 10 กรัม ผสมลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน จำนวน 15 กรัม คนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาตามที่กำหนด แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไคตินที่พองตัวในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาเติม isopropanol จำนวน 100 มิลลิลิตร เติม monochloroacetic acid 15 กรัม ซึ่งละลายใน isopropanol 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ด้วยการหยดสารละลาย monochloroacetic acid อย่างช้า ๆ และคนอย่างต่อเนื่อง ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาตามที่กำหนด แล้วนำมาเจือจางส่วนผสมของปฏิกิริยาด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 7 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนของสารละลายมาตกตะกอนด้วยเอธานอล 95% ในปริมาณ 2.5 เท่าโดยปริมาตร ตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง และนำไปทำแห้งด้วยวิธี Freeze drying ศึกษาปัจจัยและสภาวะการดัดแปร ดังนี้

1. ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 30, 40 และ 50
2. ระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยากับค่า 2, 4 และ 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศปกติ
3. ระยะเวลาทำปฏิกิริยา carboxymethylation 1 และ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

วิเคราะห์สมบัติของ CM-Chitosan ที่ผลิตได้

1. สมบัติทางเคมี ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล (Roberts and Domszy, 1982) ระดับของการกำจัดหมู่อะซิติก และระดับการแทนที่หมู่คาร์บอกรี โดย I.R. spectrometric method (Baxter *et al.*, 1992)
2. สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ความหนืดในน้ำ (Bough *et al.*, 1978)
3. สมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่
 - HLB value (Rodriquez *et al.*, 2002)
 - Emulsification Capacity and Stability (Holm and Eriksen., 1980)
 - Droplet Size Distribution of Emulsion (Rodriquez *et al.*, 2002)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980) ประเมินผลของแต่ละปัจจัยต่อสมบัติของ CM – Chitosan เปรียบเทียบกับไคโตแซนเริ่มต้น

4.2 การศึกษาสมบัติของคาร์บอกซีเมทิลไคโตแซนในผลิตภัณฑ์มายองเนส

เลือกคาร์บอกซีเมทิลไคโตแซน ที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ด้านการส่งเสริมสภาพอิมัลชัน มาศึกษาลักษณะอิมัลชันในผลิตภัณฑ์มายองเนสเปรียบเทียบกับสารแทนแทนกัม ด้วยการเติมคาร์บอกซีเมทิลไคโตแซนปริมาณร้อยละ 0.5, 1.0 และ 1.5 โดยน้ำหนักทั้งหมด ตามวิธีของ Ma และ Barbosa-Cánovas (1995) ตรวจวัดลักษณะรีโอโลยีของมายองเนส ด้วยเครื่อง Texture Analyser ยี่ห้อ Stable Micro System รุ่น TA – XY2i โดยหาค่า Storage modulus, Loss modulus, Apparent viscosity, Yield Stress, Creep และ Creep Recovery ตรวจวัด pH, Density, Oil droplet size distribution (Rodríguez *et al.*, 2002) และการประเมินผลทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)