บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา

น้ำมะพร้าวแก่รวบรวมจากโรงงานผลิตมะพร้าวขาว ในเขตบางมด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.2 การเตรียมวัตถุดิบ

การเตรียมน้ำมะพร้าวแก่เพื่อใช้ในการผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่เริ่มจากการนำน้ำมะพร้าวแก่ที่ผ่านการเติมน้ำตาลซูโครส 5% ไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ความดัน 2000 psi อุณหภูมิ 121^{o}C เป็นเวลา 15 นาที

3.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมะพร้าวแก่

นำน้ำมะพร้าวแก่มาศึกษาสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รส ทางด้านเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) ที่วัดในรูปกรดแลคติก ค่าความหวาน (Brix) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

3.4 การศึกษาผลของชนิดหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อระยะเวลาในการหมักและคุณภาพของเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก

หัวเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ได้แก่ หัวเชื้อจากนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (*Lactobacillus casei*) และหัวเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR No. 450, *Lactobacillus casei* TISTR No. 390, *Lactobacillus delbrueckii* TISTR No. 326 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย การเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลว MRS (Himedia Laboratories. PVT. LTD) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 การผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดทดลอง คือชุดทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยใช้หัวเชื้อจากนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และหัวเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii* ตามลำดับ กระบวนการผลิตเริ่มจากการเติมหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิดปริมาณ 5% ลงในน้ำมะพร้าวแก่ที่เตรียมในข้อ 3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและชีวภาพดังนี้คือวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความ

เป็นกรดที่วัดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

สำหรับการศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่นั้น ดำเนินการทดลองโดยการนำน้ำมะพร้าวแก่ที่เติมหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้นมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เหลือรอดในน้ำมะพร้าวแก่ด้วยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

3.5 การศึกษาผลของวิธีการเตรียมหัวเชื้อต่อคุณภาพของเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก

การเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ *L. acidophilus* และ *L. casei* ในอาหารเหลว MRS (Himedia Laboratories. PVT. LTD) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วง log phase จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำมะพร้าวแก่ ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง

3.5.2 การผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง คือชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ใช้หัวเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. casei* ตามลำดับ กระบวนการผลิตเริ่มจากการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 ลงในน้ำมะพร้าวแก่ที่เตรียมในข้อ 3.2 โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้นประมาณ 7 log cfu/mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและชีวภาพดังนี้คือ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรดที่วัดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

3.6 วิธีวิเคราะห์

ตรวจวัดปริมาณความชื้น (% MC) ด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ปริมาณเถ้าทั้งหมด (% Ash) ด้วยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. (AOAC, 1995) คำนวณหาปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (% TC) ตามสมการของ Navarro และคณะ (1993) วัดค่า pH ของตัวอย่างด้วย pH meter [AOAC, 1995] ค่าความเป็นกรดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) ด้วยการไทเทรตกับ 0.1 N NaoH และใช้ phenophthalien เป็นอินดิเคเตอร์ [AOAC, 1995] วัดค่าความหวาน (^{o}Brix)ด้วย Refractometer [AOAC, 1995] ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี phenol-sulfuric acid [Dubios et al., 1956] ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีนทั้งหมด โดยวิธี Macro Kjeldahl

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 2 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 245853
เลขเรียกหนังสือ

[AOAC, 1995] และนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง [Johnson and Case, 1989]

3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำและรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวน (mean ± SD) วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม minitab version 14 (Minitab Inc., United States).เพื่อวิเคราะห์ ANOVA และ least significant digit (LSD) เพื่อดูความแตกต่างของพารามิเตอร์ในแต่ละชุดทดลอง