บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ขิงสดพันธุ์ขิงหยวก ซึ่งมีอายุการเก็บเกี่ยว 5 เดือน (ระยะขิงอ่อน) และ 10 เดือน (ระยะขิงแก่) โดยน้ำหนักแง่งขิงอยู่ในช่วง 500-700 กรัม ทำการเก็บเกี่ยวจากสวนเกษตรกรในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
2. วัตถุดิบที่ใช้สำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์น้ำซุปไก่
3. น้ำนมโคชนิดสเตอริไรซ์ ยี่ห้อหนองโพ
4. น้ำนมถั่วเหลืองชนิดสเตอริไรซ์ ยี่ห้อไวตามิ้ลค์
5. สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี
6. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
7. ถุงพลาสติกไนลอน-พอลีเอทธิลีน ขนาด 20 × 25 เซนติเมตร หนา 8 ไมโครเมตร จากบริษัทเอเชียอุตสาหกรรมโฟม จำกัด

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น PQ 5002 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB 204 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศออสเตรเลีย
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W 350 ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. เครื่อง Densitometer ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น GS-700 ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. ชุดอิเลคโตรโฟรีซีส ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น MINI-PROTEIN II ประเทศสหรัฐ

   อเมริกา
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ SCIENTIFIC รุ่น DENVER 15 ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี ยี่ห้อ NOVASINA รุ่น THERMOCONSTANTER ประเทศไทย
9. เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน ยี่ห้อ WINNER PACKING ประเทศไทย
10. เครื่องทำแห้งลมร้อนแบบถาด
11. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการแปรรูป
12. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี
13. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
14. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส
15. ห้องควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขิงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

1.1 ศึกษาระยะความแก่อ่อนของขิงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

คัดเลือกตัวอย่างขิงที่มีระยะความแก่อ่อนแตกต่างกัน 2 ระดับ คือ ระยะขิงอ่อนและระยะขิงแก่ ซึ่งมีคุณภาพตามเกณฑ์คุณภาพและวิธีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบขิงเพื่ออุตสาหกรรมเกษตร (ส่วนอุตสาหกรรมเกษตร สำนักพัฒนาอุตสาหกรรมรายสาขา กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2544) นำมาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติในรูปของขิงสด ขิงผง และขิงผงสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 3 ตัวอย่าง

การสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากขิง กระทำโดยนำตัวอย่างแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 เป็นเวลา 5 นาที โดยทำการกวนเป็นเวลา

15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้จนครบเวลาตามที่กำหนด จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติ ดังนี้

1.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงวิธีของ Arima และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข1

1.1.2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงวิธีของ Arima และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข2

1.1.3 ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Bradford (1976) ดังแสดงในภาคผนวก ข3

คัดเลือกระยะความแก่อ่อนที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

หมายเหตุ * ขิงผง เตรียมโดยการนำขิงสดแก่มาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือก หั่นเป็น

ชิ้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาณความชื้นในขิงมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 10 แล้วนำขิงที่ได้มาบดให้ละเอียด และร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาด 16 เมช

1.2 ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิง

นำขิงสดที่มีระยะความแก่อ่อนที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1.1 มาทำการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 (ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์), ความเป็นกรดด่าง 7.0, 8.0 และ 9.0 (ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) และความเป็นกรดด่าง 9.0, 10.0 และ 11.0 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Arima *et al*., 2000) นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

1.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิง

นำสารละลายเอนไซม์สกัดมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 (Arima *et al*., 2000) ที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

1.4 ศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของเอนไซม์โปรติเอสของขิง

นำสารละลายเอนไซม์สกัดมาให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1

2. ศึกษาขนาดที่เหมาะสมของขิงผง วิธีการและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์โปรติเอส

จากขิงผง

2.1 ศึกษาขนาดที่เหมาะสมของขิงผงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำขิงสดที่มีระยะความแก่อ่อนที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 มาล้างทำความสะอาด แล้วปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาณความชื้นในขิงมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 10 แล้วนำขิงที่ได้มาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงร่อนที่มีขนาดแตกต่างกันคือ 14, 16 และ 18 เมช (ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 1.40, 1.18 และ 1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ) นำตัวอย่างที่ได้มาหาปริมาณความชื้น โดยวิธีของ A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก1 และตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

คัดเลือกขนาดขิงผงที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากกิจกรรมเอนไซม์และ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

2.2 ศึกษาวิธีการและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากขิงผง

นำขิงผงที่มีขนาดของการบดที่เหมาะสม ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2.1 มาทำการสกัดเอนไซม์ โดยใช้น้ำกลั่นและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ในการสกัด ในอัตราส่วน 1:4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ แล้วตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

คัดเลือกวิธีการและระยะเวลาในการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากกิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

3. ศึกษาผลของแอสคอร์เบตและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของขิงผง

นำตัวอย่างขิงซึ่งมีระยะความแก่อ่อนที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 มาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นเติมแอสคอร์เบตร้อยละ 0, 0.1 และ 0.2 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน คือ อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาณความชื้นในขิงมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 10 นำขิงที่ได้มาบดให้ละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดเมชตามที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2.1 แล้วตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

คัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมในการผลิตโดยพิจารณาจากกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทดลองข้อต่อไป

4. ศึกษาผลของอุณหภูมิ และเวลาต่อการย่อยโปรตีนบางส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโปรตีนบางชนิด

นำขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามกรรมวิธีที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 ปริมาณ 2 กรัม บรรจุในซองกระดาษ (ซองชา) ผสมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร

ที่แตกต่างกัน คือ น้ำนมโค น้ำนมถั่วเหลือง และน้ำซุปไก่ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของขิงผงต่ออาหารเป็นร้อยละ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาแตกต่างกัน คือ อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ สุ่มตัวอย่างที่ได้นำมาตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติ* ดังนี้

4.1 ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยดัดแปลงวิธีของ Beak และ Codwallader (1995) ดังแสดงในภาคผนวก ข4

4.2 ตรวจสอบรูปแบบโปรตีน ด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยดัดแปลงวิธีของ Laemmli (1970) ดังแสดงในภาคผนวก ข5

4.3 ตรวจสอบความเข้มของแถบโปรตีนด้วยเครื่อง Densitometer

หมายเหตุ * แยกวิเคราะห์คุณสมบัติระหว่างผลิตภัณฑ์น้ำนมโค น้ำนมถั่วเหลือง และน้ำซุปไก่

การเตรียมน้ำซุปไก่

ส่วนผสม

น้ำเปล่า	1	ลิตร
เนื้อไก่สับ	100	กรัม
เกลือ	2	กรัม
น้ำตาลทราย	2	กรัม

วิธีทำ

ต้มน้ำให้เดือด เติมส่วนผสมทั้งหมดลงไป ลดไฟลงและต้มต่อไปนาน 20 นาที จากนั้นยกลงและพักไว้ประมาณ 15 นาที แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างการเก็บรักษา

เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากคัดเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 โดยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในถุงพลาสติกไนลอน-โพลีเอทธิลีน ภายใต้สภาวะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 2 ระดับ คืออุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ในสัปดาห์ที่ 0, 1 และ 2 หลังจากนั้นวิเคราะห์ทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน โดยตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติ ดังนี้

5.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

5.1.1 ตรวจวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี (water activity) ด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี ดังแสดงในภาคผนวก ก2

5.2 คุณสมบัติทางเคมี

5.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงวิธีของ Arima และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข1

5.2.2 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงวิธีของ Arima และคณะ (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ข2

5.2.3 ปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Bradford (1976) ดังแสดงในภาคผนวก ข3

5.3 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์ทุก 1 เดือน โดยตรวจวิเคราะห์

5.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค1

5.3.2 โคลิฟอร์ม โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค2

5.3.3 *Salmonella sp.* โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค3

5.3.4 *Staphylococcus aureus* โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค4

5.3.5 *Clostridium perfringens* โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค5

5.3.6 ยีสต์และรา โดยวิธี A.O.A.C. (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ค6

5.4 ทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำตัวอย่างขิงผงมาทดสอบทางประสาทสัมผัสในรูปของน้ำนมถั่วเหลืองรสขิง โดยนำขิงผงบรรจุซองมาจุ่มในน้ำนมถั่วเหลืองอุ่น เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการทดสอบด้านกลิ่นรสขิงและการยอมรับด้วยวิธี Hedonic-5-scale (Lawless and Heymann, 1999) โดยใช้แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ง1 ทำการสุ่มวิเคราะห์ตัวอย่างทุก 1 เดือน

6. ทดสอบผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองรสขิงต่อการยอมรับของผู้บริโภค

ผลิตขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามกรรมวิธีที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 3 มาทดสอบการยอมรับในรูปของผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองรสขิง โดยนำขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสบรรจุซองมาจุ่มในน้ำนมถั่วเหลืองอุ่น เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการทดสอบการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภคในพื้นที่อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 100 คน ออกแบบสอบถามที่เกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม พฤติกรรมการบริโภค และความชอบผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Hedonic-5-scale (คะแนน 5 หมายถึง ชอบมาก และคะแนน 1 หมายถึง ไม่ชอบมาก) (Lawless and Heymann, 1999) โดยใช้แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ง2

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยในข้อ 1, 2 และ 5 วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และการทดสอบทางประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ขณะที่การวิจัยในข้อ 3 และ 4 วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (3×3) และ (2×3) +1 ใน CRD ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis

of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (จิราพร ชมพิกุล, 2532)