# บทที่ 4

## ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 <u>ศึกษาหาระดับสุญญากาศและเวลาที่เหมาะสมของการแช่เห็ดในสารละลายโซเดียม-เมตาไบซัลไฟต์เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาสีน้ำตาล</u>

นำเห็ดที่ตัดแต่งแล้ว แช่ในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 1.5% เพราะจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการแช่เห็ดในสารละลายดังกล่าวที่ระดับสุญญากาศ 20 นิ้วปรอท เป็นเวลา 30 นาที สารมารถยับยั้งปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้ดี โดยแปรระดับสุญญากาศในการแช่เป็น 10, 20 และ 30 นิ้วปรอท และแปรเวลาในการแช่เป็น 10, 20 และ 30 นาที โดยทำการทดลองดังนี้

เห็ดที่ตัดแต่งแล้วประมาณ 180 กรัม (9-11 ดอก)

↓

แช่สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 1.5% ปริมาตร 400 ml

โดยแปรระดับสุญญากาศในการแช่เห็ดเป็น 10 20 และ 30 นิ้วปรอท

เวลาในการแช่เห็ด เป็น 10 20 และ 30 นาที

↓

- ทดสอบ PPO test ที่ผิวภายนอกดอกเห็ด
- ค่าความสว่าง (L) ของผิวภายนอกดอกเห็ด

<u>การติดตามผล</u>

- ทดสอบเอนไซม์ polyphenoloxidase ที่เหลืออยู่
- วัดค่าความสว่าง (L)

เลือกระดับสุญญากาศและเวลาที่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์ polyphenoloxidase ที่เหลืออยู่บนผิวดอกเห็ดเป็นเครื่องหมาย - และระดับความสว่างของเห็ด (L) สูง

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Symmetric Factorial Experiment ขนาด 3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.2 <u>ศึกษาระดับของสารละลายกัมแต่ละชนิดที่เหมาะสมต่อเนื้อสัมผัสและความสามารถในการอุ้มน้ำของเห็ด</u>

นำเห็ดที่ผ่านการยับยั้งปฏิกิริยาสีน้ำตาลตามสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 41 มาแช่สารละลายกัมชนิดต่างๆ โดยแปรชนิดและความเข้มข้นของกัมดังนี้

ก. สารละลาย guar gum ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1%

ข. สารละลาย Sodium carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้น 0, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6%

ค. สารละลาย xanthan gum ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1%

ง. สารละลาย locust bean gum (LBG) ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1%

โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

เห็ดที่ตัดแต่งแล้วประมาณ 180 กรัม

↓

แช่สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 1.5%, 400 ml

ตามระดับสุญญากาศและเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 1

↓

ทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงลวด 5 นาที

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

↓

แช่สารละลายกัมที่ระดับสุญญากาศ 30 นิ้วปรอท เป็นเวลา 30 นาที

↓

แช่ต่อในสภาวะปกติ 10 นาที

↓

ล้างกัมที่ผิวนอกออก

↓

ทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงลวด 5 นาที

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

↓

ลวกในน้ำเดือด 2 นาที

↓

cooling ในน้ำเย็น 5 นาที

↓

ทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงลวด 10 นาที

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

↓

แช่เยือกแข็งด้วยไครโอจีนิคอุณหภูมิ –50 °C

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

↓

เก็บที่อุณหภูมิ –18 °C 7 วัน

↓

ละลายในตู้เย็น 15 ชั่วโมง

↓

ทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงลวด 5 นาที

↓

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

<u>การติดตามผล</u>

- หาค่าร้อยละของน้ำหนักเห็ดที่เพิ่มขึ้นหลังการแช่สารละลายกัม (% weight gain)
- หาค่าร้อยละของน้ำหนักเห็ดที่ลดลงเนื่องจากการลวก (% blanching loss)
- หาค่าร้อยละของน้ำหนักเห็ดที่ลดลงเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง (% freezing loss)
- หาค่าร้อยละของน้ำหนักเห็ดที่ลดลงเนื่องจากการละลาย (% thawing loss)
- หาค่าร้อยละของน้ำหนักเห็ดที่ลดลงของทั้งกระบวนการผลิตตั้งแต่ก่อนแช่สารละลายกัมจนถึงหลังละลาย (% total loss)
- วัดค่า shear value ของเห็ด

เลือกระดับความเข้มข้นของสารละลายกัมแต่ละชนิดที่ให้ค่า %weight gain ของเห็ดสูงที่สุด แต่มีค่า %blanching loss, %freezing loss, %thawing loss, %total loss และ shear value ของเห็ดต่ำที่สุด

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่า %weight gain , % blanching loss, %freezing loss , %thawing loss, %total loss และ shear value ที่ได้จากการแช่เห็ดในสารละลายกัมชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.3 <u>ศึกษาชนิดของสารละลายกัมที่เหมาะสมต่อเนื้อสัมผัสและความสามารถในการอุ้มน้ำของเห็ด</u>

แช่เห็ดในสารละลายกัมชนิดต่างๆตามวิธีและความเข้มข้นที่เหมาะสมและเลือกได้ตามข้อ 4.2 โดยแปรชนิดของสารละลายกัมเป็น 4 ชนิด คือ

ก. guar gum

ข. CMC

ค. xanthan gum

ง. LBG

<u>การติดตามผล</u>

- หาค่า % weight gain
- หาค่า % blanching loss
- หาค่า % freezing loss
- หาค่า % thawing loss
- หาค่า % total loss
- วัดค่า shear value
- ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏภายนอกและภายในสี ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 12 คน

เลือกชนิดของสารละลายกัมที่ให้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆสูงที่สุด โดยพิจารณาร่วมกับการมีค่า %weight gain สูงที่สุด แต่ให้ค่า %blanching loss, %freezing loss, %thawing loss, %total loss และ shear value ของเห็ดต่ำที่สุด

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Completely Randomized Design เปรียบเทียบ ค่า %weight gain , %freezing loss , %thawing loss, % total loss และ shear value ที่ได้จากการแช่สารละลายกัมชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ทดลอง 4 ซ้ำ และใช้ Randomized Complete Block Design ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเห็ด ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแช่เยือกแข็งเห็ดด้วยวิธี air blast และไครโอจีนิค

4.4.1 ศึกษาหาเวลาในการแช่เยือกแข็งเห็ดแบบ air blast

นำเห็ดที่ผ่านการแช่สารละลายกัมตามที่เลือกจากข้อ 4.3 มาแช่เยือกแข็งใน air blast freezer โดยใช้เห็ดครั้งละ 720 กรัม (หรือประมาณ 40 ดอก) อุณหภูมิลมเย็นในตู้ประมาณ -32°C นำดอกเห็ด 1 ดอก มาเจาะและเสียบ probe เข้าไปที่ใจกลางดอกเห็ด เพื่อวัดและติดตามอุณหภูมิในระหว่างแช่เยือกแข็ง โดยต่อสาย probe เข้ากับเครื่องบันทึกอุณหภูมิ (CHINO, DR 015) บันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นของใจกลางดอกเห็ดและเวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นจนอุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -18°C

การติดตามผล

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการแช่เยือกแข็งกับอุณหภูมิของใจกลางดอกเห็ด ประมาณเวลาที่ใช้แช่เยือกแข็งจากกราฟดังกล่าว โดยลากเส้นขนานกับแกน X ที่ -18°C ให้เป็นเส้นที่ 1 และลากเส้นขนานกับแกน Y ผ่านจุดตัดของเส้นที่ 1 กับกราฟ ได้เส้นที่ 2 อ่านค่าที่จุดตัดของเส้นที่ 2 บนแกน X จะได้เวลาในการแช่เยือกแข็ง

4.4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแช่เยือกแข็งเห็ดแบบไครโอจีนิค

เตรียมเห็ดที่ผ่านการแช่สารละลายกัมตามวิธีที่เลือกจากข้อ 4.3 มาแช่เยือกแข็งด้วยวิธีไครโอจีนิค โดยมี liquid nitrogen เป็นตัวกลางในการแช่เยือกแข็ง ในการทดลองใช้ตัวอย่างครั้งละ 720 กรัม (หรือประมาณ 40 ดอก) แปรอุณหภูมิแช่เยือกแข็งเป็น 4 ระดับ คือ -50, -60, -70 และ -80°C นำดอกเห็ด 1 ดอกมาเจาะและเสียบ probe เหมือนในข้อ 4.4.1 วัดอุณหภูมิที่ใจกลางดอกเห็ดระหว่างการแช่เยือกแข็ง บันทึกอุณหภูมิเริ่มต้นของใจกลางดอกเห็ดและเวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นจนอุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -18°C

การติดตามผล

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการแช่เยือกแข็งกับอุณหภูมิของใจกลางดอกเห็ด ประมาณเวลาที่ใช้แช่เยือกแข็งจากกราฟดังกล่าว ตามวิธีในข้อ 4.4.1

4.4.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแช่เยือกแข็งเห็ดแบบไครโอจีนิค

เตรียมเห็ดที่ผ่านการแช่สารละลายกัมตามวิธีที่เลือกจากข้อ 4.3 มาแช่เยือกแข็งใน cryogenic freezer โดยใช้ตัวอย่างครั้งละ 720 กรัม (หรือประมาณ 40 ดอก) แปรอุณหภูมิแช่เยือกแข็งเป็น 4 ระดับ คือ -50, -60, -70 และ -80°C แช่เยือกแข็งตามข้อ 4.4.2 จนอุณหภูมิใจกลางเห็ดเท่ากับ -18°C แล้วบรรจุผลิตภัณฑ์ในถุง HDPE และปิดผนึกแบบปกติ เก็บในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 7 วัน ละลายน้ำแข็งโดยทิ้งไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

การติดตามผล

- หาค่า % freezing loss
- หาค่า % thawing loss
- วัดค่า shear value
- ปริมาณการใช้ liquid nitrogen โดยประมาณจากการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ chamber เท่ากับ -50, -60, -70 และ -80°C
- ปริมาณของ liquid nitrogen ที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง โดยวิธีชั่งน้ำหนัก
- ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏทั้งภายนอกและภายใน สี ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 12 คน

เลือกอุณหภูมิแช่เยือกแข็งซึ่งให้เห็ดที่มีคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆ สูงที่สุด โดยพิจารณาร่วมกับการมีค่า % freezing loss, % thawing loss, ปริมาณการใช้ liquid nitrogen และ shear value ของเห็ดต่ำที่สุด

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่า %freezing loss, %thawing loss และ shear value ทดลอง 4 ซ้ำ และใช้ Randomized Complete Block Design ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเห็ด ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test หาปริมาณการใช้ liquid nitrogen โดยประมาณจากการแช่เยือกแข็ง ทดลอง 2 ซ้ำ

4.5 ศึกษาผลของวิธีละลายที่เหมาะสมต่อคุณภาพเห็ดแช่เยือกแข็ง

เตรียมเห็ดแช่เยือกแข็งตามวิธีในข้อ 4.4.3 นำเห็ดทั้งถุงที่ปิดสนิทมาละลายโดยแปรวิธีการละลายเป็น 3 วิธี คือ ละลายในตู้เย็นเป็นเวลา 15 ชั่วโมง โดยละลายเห็ดทั้งถุงในน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และละลายด้วยไมโครเวฟกำลังไฟฟ้า 700 W เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที

การติดตามผล

- หาค่า %thawing loss
- วัดค่า shear value
- ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏทั้งภายนอกและภายใน สี ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน

เลือกวิธีการละลายที่ให้คะแนนการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสสูง โดยพิจารณาร่วมกับการมีค่า %thawing loss และ shear value ของเห็ดต่ำ

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่า %thawing loss และ shear value ทดลอง 4 ซ้ำ และใช้ Randomized Complete Block Design ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเห็ด ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.6 ศึกษาผลของวิธีแช่เยือกแข็ง วิธีบรรจุ และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์

เตรียมเห็ดตามข้อ 4.3 นำมาแช่เยือกแข็งโดยแปรวิธีแช่เยือกแข็งเป็น 2 วิธี คือ air blast ที่อุณหภูมิ -32°C ตามเวลาที่ได้จากข้อ 4.4.1 แบบไครโอจีนิคตามเวลาและอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 4.4.2 และ 4.4.3 ตามลำดับ แปรวิธีการบรรจุเป็น 2 วิธี คือ แบบสุญญากาศ บรรจุในถุง nylon/LLDPE และแบบปกติ บรรจุในถุง HDPE เพราะการบรรจุแบบสุญญากาศมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดอากาศโดยเฉพาะ $O_2$ ดังนั้นจึงต้องนำ nylon มา laminate กับ PE เพื่อเพิ่มสมบัติการเป็น gas barrier ให้กับภาชนะบรรจุ แล้วเก็บในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -18°C สุ่มตรวจคุณภาพตัวอย่างเริ่มต้นและทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 6 เดือน

การติดตามผล

- หาค่า %thawing loss
- วัดค่าความสว่าง (L)
- วัดค่า shear value
- ศึกษาโครงสร้างภายในเห็ดด้วย SEM ก่อนแช่เยือกแข็ง หลังแช่เยือกแข็ง และเมื่อเก็บเป็นเวลา 6 เดือน ของเห็ดแช่เยือกแข็งด้วยวิธีไครโอจีนิคและ air blast ที่บรรจุแบบสุญญากาศ
- ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน ลักษณะปรากฏภายนอกและภายใน สี กลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบรวม โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน จำนวน 12 คน
- ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ โดยตรวจหา
    - ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count)
    - ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold)

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 2x2x7 วิเคราะห์ค่า %thawing loss, shear value และ ความสว่าง (L) ทดลอง 4 ซ้ำ และใช้ Asymmetric Factorial with Randomized Complete Block Design ขนาด 2x2x7 ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเห็ด ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.7 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการแช่เห็ดในสารละลาย xanthan gum ร่วมกับ LBG ต่อเนื้อสัมผัสและความสามารถในการอุ้มน้ำของเห็ด

4.7.1 ศึกษาหาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมของการแช่เห็ดในสารละลาย xanthan gum และ LBG

นำเห็ดที่ตัดแต่งแล้วประมาณ 180 กรัม มายับยั้งปฏิกิริยาสีน้ำตาลตามสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 4.1 ก่อนนำมาแช่สารละลายกัม 2 ชนิด คือ แช่เห็ดในสารละลาย xanthan gum 400 ml ก่อนเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงแช่ต่อในสารละลาย LBG 400 ml เป็นเวลา 15 นาที กำหนดให้ความเข้มข้นของสารละลายกัมทั้ง 2 ชนิดรวมกันเท่ากับ 0.75% โดยแปรความเข้มข้นของสารละลายระหว่าง xanthan gum : LBG ดังนี้

ก. 0.525% : 0.225%

ข. 0.375% : 0.375%

ค. 0.225% : 0.525%

การติดตามผล

- หาค่า % weight gain
- หาค่า % blanching loss
- หาค่า % freezing loss
- หาค่า % thawing loss
- หาค่า % total loss
- วัดค่า shear value

เลือกความเข้มข้นของสารละลายกัมที่ให้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆ สูงที่สุด โดยพิจารณาร่วมกับการมีค่า %weight gain สูง แต่ให้ค่า %blanching loss, %freezing loss, %thawing loss, %total loss และ shear value ต่ำ

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ Completely Randomized Design เปรียบเทียบ ค่า %weight gain , %freezing loss , %thawing loss, % total loss และ shear value ที่

ได้จากการแช่สารละลายกัมชนิดต่างๆ ทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.7.2 ศึกษาหาระดับความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของการแช่เห็ดในสารละลาย xanthan gum ร่วมกับ LBG

แช่เห็ดในสารละลายกัม 2 ชนิด ตามอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 4.7.1 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นสารละลาย xanthan gum และ LBG รวมกันได้เท่ากับ 0.25%, 0.5% และ 0.75% ดังนั้นจึงแปรความเข้มข้นของสารละลาย xanthan gum : LBG ได้ดังนี้ 0.125% : 0.125%, 0.25% : 0.25% และ 0.375% : 0.375% ตามลำดับ และแปรเวลาของการแช่เห็ดในสารละลาย xanthan gum : LBG ได้ดังนี้ 10 นาที : 20 นาที, 15 นาที : 15 นาที และ 20 นาที : 10 นาที

การติดตามผล

- หาค่า % weight gain
- หาค่า % blanching loss
- หาค่า % freezing loss
- หาค่า % thawing loss
- หาค่า % total loss
- วัดค่า shear value

เลือกชนิดของสารละลายกัมที่ให้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆสูง โดยพิจารณาร่วมกับการมีค่า %weight gain สูงสุด แต่ให้ค่า %blanching loss, %freezing loss, %thawing loss, %total loss และ shear value ต่ำ

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Symmetric Factorial Experiment ขนาด 3x3 เปรียบเทียบ ค่า %weight gain , %freezing loss , %thawing loss, % total loss และ shear value ที่ได้จากการแช่สารละลายกัมชนิดต่างๆ ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.8 ศึกษาหาปริมาณ glycine ที่เหมาะสม เพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์เห็ดแช่เยือกแข็ง

เตรียมเห็ดตามวิธีที่เหมาะสมในข้อ 4.4 แต่ในขั้นตอนการ cooling เห็ดในน้ำเย็นหลังจากการลวก จะทำการเติม glycine ลงใน cooling water โดยแปรความเข้มข้นของสารละลาย glycine เป็น 0, 0.5 และ 1% ก่อนนำไปแช่เยือกแข็งแบบไครโอจีนิค และละลายตามวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.5

การติดตามผล

ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรส (แบบสอบถามแสดงในภาคผนวก ง.2) โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 12 คน

เลือกระดับความเข้มข้นของสารละลาย glycine ที่ให้คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงที่สุด

วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test