บทที่ 4

วิธีทดลอง

4.1 จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

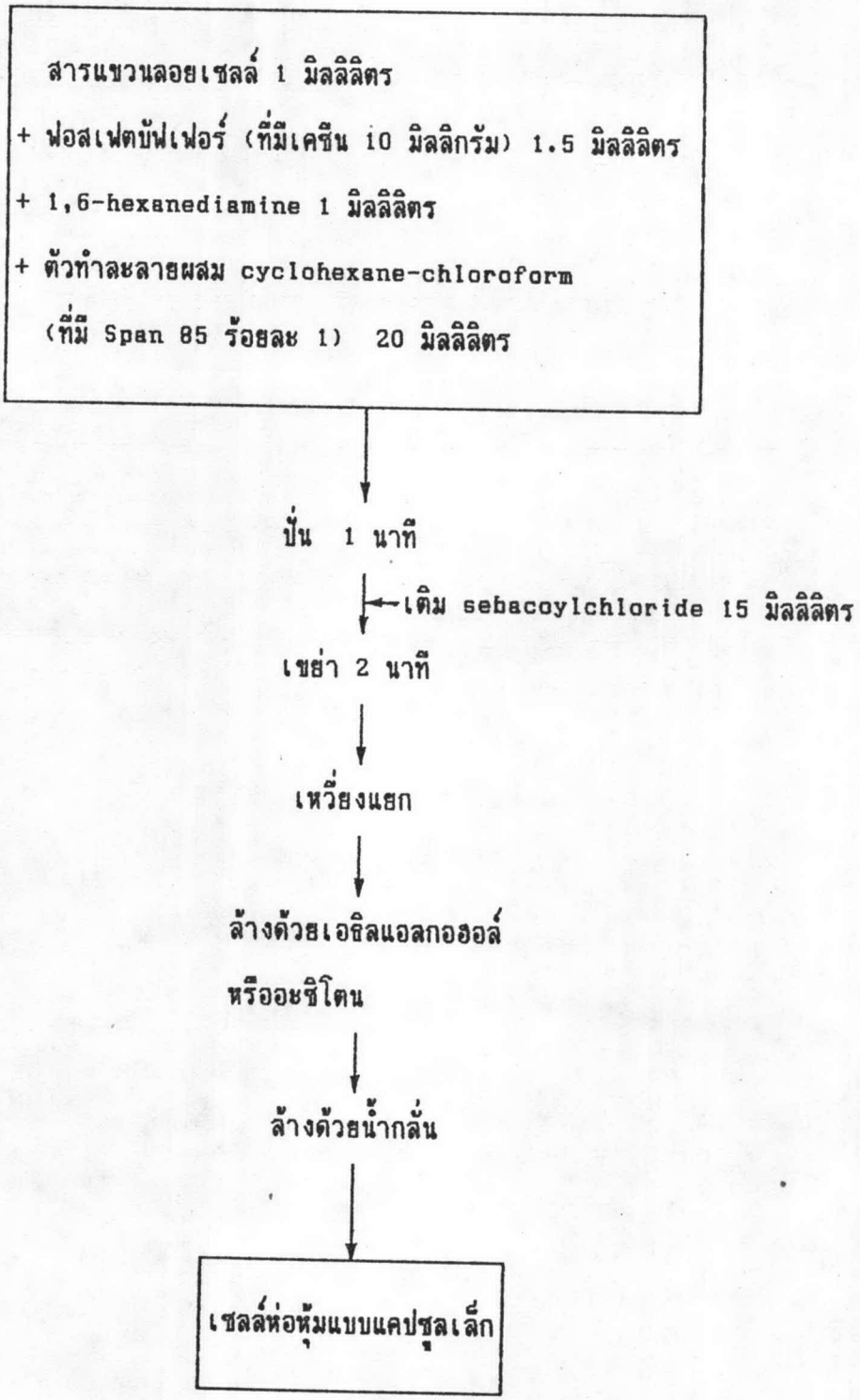
4.1.1 *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 108 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว GYP (ภาคผนวก ก-1) และนำอาหารเหลว GYP ที่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตอยู่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Atlas et al, 1984) และปริมาณการผลิตกรดแลคติกตามวิธีในภาคผนวก ก-3 ทุก 3 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณการผลิตกรดแลคติกกับเวลา

4.1.2 *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-2547 เพาะเลี้ยงแบบเขย่าในอาหารเหลว YM (ภาคผนวก ก-2) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำอาหารเหลว YM ที่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตอยู่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ตามวิธีในภาคผนวก ก-4 ทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์กับเวลา

4.2 วิธีเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก

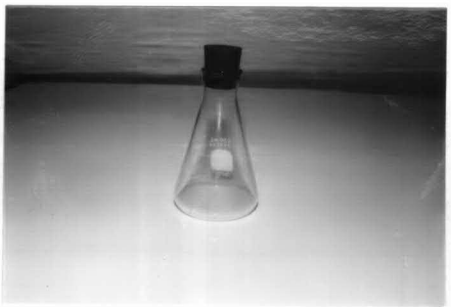
การเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กใช้วิธี interfacial polymerization โดยมี 1,6-hexanediamine เป็นมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิก sebacoylchloride เป็นมอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิก และ cyclohexane-chloroform เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยดัดแปลงจากวิธีที่อธิบายโดย Mori และคณะ (1972) และ Chang, MacIntosh และ Mason (1966) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

เติมสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ *L. delbrueckii* ประมาณ $4.5\text{-}10.0\times10^{8}$ หรือเซลล์ *Z. rouxii* ประมาณ $2.0\text{-}5.2\times10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีการหาจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์แสดงดังภาคผนวก ก-10) จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 (ภาคผนวก ก-9) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีเคซีน 10 มิลลิกรัม เติมสารละลาย 1,6-hexanediamine จำนวน 1 มิลลิลิตร และตัวทำละลายผสมของ cyclohexane-chloroform ที่มี Span 85 ร้อยละ 1 โดยปริมาตร เป็นอิมัลซิไฟเออร์ จำนวน 20 มิลลิลิตร จากนั้นผสมส่วนผสมทั้งหมดด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วเติมสารละลาย sebacoyl-chloride ในตัวทำละลายผสมชนิดเดียวกัน จำนวน 15 มิลลิลิตร เขย่าต่อด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยง หลังจากนั้นล้างเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ที่ได้ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และล้างเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* ที่ได้ด้วยอะซิโตน เพื่อกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ที่ตกค้างอยู่ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดเอธิลแอลกอฮอล์และอะซิโตน ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กแสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 จากนั้นเก็บรักษาเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กที่ได้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดลอง



รูปที่ 4.1 แผนภูมิขั้นตอนการเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก
โดยวิธี interfacial polymerization

(1)



(2)

รูปที่ 4.2.1 ปั่นส่วนผสมทั้ง 5 หลอดรวมกันโดยใช้เครื่องปั่น (1) โดย หลอดที่ 1=สารแขวนลอยเซลล์ หลอดที่ 2=ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ หลอดที่ 3=เคซีน หลอดที่ 4=1,6-hexanediamine และหลอดที่ 5=ตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform จะได้ส่วนผสมดังรูปที่ 4.2.1 (2)

↓

รูปที่ 4.2.2 เขย่าส่วนผสมที่ได้จากการปั่นรวมกับ sebacoylchloride

↓

(ต่อ)

(ต่อ)

↓

รูปที่ 4.2.3 เหวี่ยงแยกส่วนผสมที่ได้ทั้งหมด

↓

ล้างด้วยเอธิลแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน และน้ำกลั่น

↓

รูปที่ 4.2.4 เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก

รูปที่ 4.2 ภาพแสดงขั้นตอนการเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก
โดยวิธี interfacial polymerization

4.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก

4.3.1 การกำหนดความเข้มข้นของ 1,6-hexanediamine, sebacoylchloride และอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform ที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มเซลล์ของ *L. delbrueckii*

แปรความเข้มข้นของ 1,6-hexanediamine ในน้ำกลั่น 3 ระดับคือ ร้อยละ 1, 2 และ 3 โดยน้ำหนัก แปรความเข้มข้นของ sebacoylchloride ในตัวทำละลายผสมของ cyclohexane-chloroform 3 ระดับคือ ร้อยละ 3, 4 และ 5 โดยปริมาตร และแปรอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform 3 ระดับคือ 1:1, 3:1 และ 5:1 โดยปริมาตร

วัดปริมาณการผลิตกรดแลคติกในอาหารเหลว GYP ที่มีเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กอยู่ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เลือกภาวะการทดลองที่มีผลให้เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กผลิตกรดแลคติกสูงสุด โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ symmetric factorial experiment ขนาด 3x3x3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ค)

4.3.2 การกำหนดความเข้มข้นของ 1,6-hexanediamine, sebacoylchloride และอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform ที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มเซลล์ของ *Z. rouxii*

แปรความเข้มข้นของ 1,6-hexanediamine ในน้ำกลั่น 3 ระดับคือ ร้อยละ 6, 7 และ 8 โดยน้ำหนัก แปรความเข้มข้นของ sebacoylchloride ในตัวทำละลายผสมของ cyclohexane-chloroform 3 ระดับคือ ร้อยละ 6, 7 และ 8 โดยปริมาตร และแปรอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform 3 ระดับคือ 1:1, 3:1 และ 5:1 โดยปริมาตร

วัดปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ในอาหารเหลว YM ที่มีเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กอยู่ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เลือกภาวะการทดลองที่มีผลให้เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กผลิตแอลกอฮอล์สูงสุด โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ symmetric factorial experiment ขนาด 3x3x3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ค)

ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.3.1 และ 4.3.2 นี้ จะใช้ในการเตรียมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก สำหรับการทดลองตั้งแต่ข้อ 4.4 เป็นต้นไป

4.4 การศึกษาลักษณะของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก

4.4.1 การตรวจสอบการหลุด (leakage) ของเซลล์แบคทีเรียและยีสต์ที่มีชีวิตจากแคปซูลเล็ก

4.4.1.1 การหลุดของเซลล์ *L. delbrueckii* จากแคปซูลเล็ก

เพาะเลี้ยงเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และปริมาณการผลิตกรดแลคติกทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.4.1.2 การหลุดของเซลล์ *Z. rouxii* จากแคปซูลเล็ก

เพาะเลี้ยงเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ชนิดเหลว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.4.2 การพิจารณาลักษณะของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของแบคทีเรียและยีสต์จากภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน

การเตรียมตัวอย่างเนื่อตรวจสอบลักษณะของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กจากภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (scanning electron micrograph, SEM) ทำตามวิธีที่อธิบายโดยเวคิน นพนิตย์ (2527) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

แช่เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กแต่ละชนิดหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ ๆ ในสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร (ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 เป็นตัวทำละลาย) นาน 3 ชั่วโมง เทสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ออก จากนั้นแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 35 50 70 80 95 และ 100 ความเข้มข้นละ 15 นาที ตามลำดับ อบเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กให้แห้งโดยวิธี critical point drying และเคลือบทองด้วยเครื่อง fine coat นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบโครงสร้างของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กแต่ละชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

4.4.3 ความทนทานของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กต่อเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก

4.4.3.1 แคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii*

เพาะเลี้ยงเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ชนิดเหลวที่มีเกลือ (sodium chloride) อยู่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำไปวัดปริมาณการผลิตกรดแลคติกทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.4.3.2 แคปซูลเล็กของ *Z. rouxii*

เพาะเลี้ยงเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ชนิดเหลวที่มีเกลืออยู่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำไปวัดปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ทุก ๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4.5 การหมักน้ำซีอิ๊ว

4.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตจากข้อ 3.4.1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบดังนี้

4.5.1.1 กรดแลคติก ตามวิธีในภาคผนวก ก-3

4.5.1.2 แอลกอฮอล์ ตามวิธีในภาคผนวก ก-4

4.5.1.3 กลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก-5

4.5.1.4 ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ตามวิธีในภาคผนวก ก-6

4.5.1.5 กรดอะมิโนไนโตรเจน (amino acid nitrogen) ตามวิธีในภาคผนวก ก-7

4.5.1.6 เกลือ (sodium chloride) ตามวิธีในภาคผนวก ก-8

4.5.1.7 ความถ่วงจำเพาะ โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ วัดที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส

4.5.1.8 pH โดยใช้เครื่องวัด pH วัดที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส

4.5.2 การหมักน้ำซีอิ๊วแบบไม่ต่อเนื่อง

มีขั้นตอนการบ่มเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ไว้ในอาหารเหลว GYP ที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และบ่มเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* ในอาหารเหลว YM ที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดลองดังต่อไปนี้

บ่มเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เติมกลูโคส ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และนำมาวัดปริมาณการผลิตกรดแลคติกทุก ๆ 1 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ออก แล้วบ่มเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ในสารละลายที่กรองได้ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำไปวัดปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์ ทุก ๆ 1 สัปดาห์

4.5.3 การหมักน้ำซีอิ๊วโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็ก

4.5.3.1 การกำหนดความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน

ในการกำหนดความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันของของไหลในคอลัมน์ทดลองโดยอาศัยหลักเกณฑ์ที่อธิบายโดย พล สาเกทอง (2526) ดังนี้

บรรจุเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กชนิดใดชนิดหนึ่งในคอลัมน์ 3 คอลัมน์ ซึ่งมีการไหลของเหลวเข้าและออกต่อเนื่องกัน จำนวน 3 คอลัมน์ ๆ ละ 10 กรัม โดยน้ำหนักเปียก เปิดวาล์วควบคุมการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยอัตราเร็ว 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที เข้าทางด้านบนคอลัมน์แรก โดยมีการไหลสวนทางกับการไหลของแก๊สไนโตรเจน ตั้งหม้อแปลงไฟฟ้ากระแสสลับที่ 7.5 V แปรอัตราการไหลขาเข้าแก๊สไนโตรเจนในช่วง 15-18 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ทางด้านล่างของแต่ละคอลัมน์ และอ่านค่าความดันตกในหน่วยมิลลิเมตรของปรอทจากมานอมิเตอร์ที่ต่อเชื่อมกับคอลัมน์แรก ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2 คำนวณหาความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชัน (V_{mf}) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างผลต่างของความดันตกและความเร็วของแก๊สไนโตรเจน

4.5.3.2 การหมักกรดแลคติกในน้ำซีอิ๊วโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii*

แปรปริมาณกลูโคสในโปรตีนไฮโดรไลเซต 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0, 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปทดลองหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพทั้ง 3 คอลัมน์ โดยให้อัตราการไหลของโปรตีนไฮโดรไลเซตเท่ากับ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิของโปรตีนไฮโดรไลเซตในคอลัมน์ด้วยน้ำที่ไหลในชั้นรอบนอกของคอลัมน์ตลอดเวลาที่ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กเท่ากับ 10 กรัมต่อคอลัมน์ กำหนดอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนมีค่าเท่ากับความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันที่วัดได้จากข้อ 4.5.3.1 ใช้เวลาในการทดลองหมักอย่างต่อเนื่อง 36 ชั่วโมง โดยให้สารละลายขาออกจากคอลัมน์สุดท้ายไหลวนซ้ำ (recycle) กับโปรตีนไฮโดรไลเซตเริ่มต้น ซึ่งจะไหลเข้าสู่คอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ตลอดช่วงการหมัก ติดตามผลการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณการผลิตกรดแลคติกและปริมาณกลูโคสที่เหลือและวัด pH ในน้ำซีอิ๊วทุกช่วง 3 ชั่วโมง

4.5.3.3 <u>การหมักแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊วโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii*</u>

กรองแยกเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* ออกจากสารละลายที่ได้จากการหมักในข้อ 4.5.3.2 แล้วนำมาหมักต่อโดยใช้เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *Z. rouxii* จำนวน 10 กรัมต่อคอลัมน์ จำนวน 3 คอลัมน์ ควบคุมอัตราการไหลของสารละลายที่ได้เท่ากับ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายในคอลัมน์ด้วยน้ำที่ไหลชั้นนอกของคอลัมน์ตลอดเวลาที่ 25 องศาเซลเซียส กำหนดอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจนมีค่าเท่ากับความเร็วต่ำสุดของการเกิดฟลูอิไดเซชันที่วัดได้จากข้อ 4.5.3.1 ใช้เวลาในการหมักอย่างต่อเนื่อง 36 ชั่วโมง โดยให้สารละลายขาออกจากคอลัมน์สุดท้ายไหลวนซ้ำเข้าไปรวมกับสารละลายที่ได้จากการหมักเริ่มต้น ซึ่งจะไหลเข้าสู่คอลัมน์ที่ 1, 2 และ 3 ตลอดช่วงการหมัก ติดตามผลการหมักโดยวิเคราะห์ปริมาณการผลิตแอลกอฮอล์และปริมาณกลูโคสที่เหลือและวัด pH ในน้ำซีอิ๊วทุกช่วง 3 ชั่วโมง

เลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักโดยพิจารณาจากน้ำซีอิ๊วที่มีปริมาณการผลิตกรดแลคติกและแอลกอฮอล์สูงสุดและมีปริมาณกลูโคสเหลือน้อยที่สุด

4.5.3.4 <u>การพิจารณาลักษณะของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กหลังการหมักน้ำซีอิ๊วโดยภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน</u>

แช่เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ *L. delbrueckii* และ *Z. rouxii* หลังการใช้ทดลองหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 4.5.3.2 และ 4.5.3.3 ในสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ และทดลองต่อตามวิธีในข้อ 4.4.2 จากนั้นพิจารณาเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กก่อนและหลังการหมักน้ำซีอิ๊ว

4.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

กรองแยกน้ำซีอิ๊วที่ได้ แล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และทำให้เย็น บรรจุในภาชนะบรรจุสะอาด เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ฟิสิกส์ และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ประเภทเดียวกันหรือคล้ายกันที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ดังนี้

4.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้และตัวอย่างน้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

4.6.1.1 กรดแลคติก ตามวิธีในภาคผนวก ก-3

4.6.1.2 แอลกอฮอล์ ตามวิธีในภาคผนวก ก-4

4.6.1.3 กลูโคส ตามวิธีในภาคผนวก ก-5

4.6.1.4 ไนโตรเจนทั้งหมด ตามวิธีในภาคผนวก ก-6

4.6.1.5 กรดอะมิโนไนโตรเจน ตามวิธีในภาคผนวก ก-7

4.6.1.6 เกลือ ตามวิธีในภาคผนวก ก-8

4.6.1.7 ความถ่วงจำเพาะ โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ วัดที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส

4.6.1.8 pH โดยใช้เครื่องวัด pH วัดที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส

โดยกำหนดให้

น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้ หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมและผ่านการพาสเจอร์ไรส์

ตัวอย่างที่ 1 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 1

ตัวอย่างที่ 2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 2

ตัวอย่างที่ 3 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 1

ตัวอย่างที่ 4 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ชนิดที่ 2

จากนั้นเลือกตัวอย่างน้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสที่มีปริมาณกรดแลคติกและแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกับน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ส่วนประกอบที่ให้กลิ่นตามข้อ 4.6.2 และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่อไป

4.6.2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบที่ให้กลิ่นโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟ

การวิเคราะห์ส่วนประกอบที่ให้กลิ่น (aroma components) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟ ทำตามวิธีที่อธิบายใน Yokotsuka (1960), Shibamoto (1984) Osaki และคณะ (1985) และ Berlin (1989) ซึ่งมีขั้นตอนพอสรุปได้ดังนี้

บรรจุตัวอย่างจำนวน 40 มิลลิลิตร ในขวดแก้วที่มีฝาปิดเป็นซิลิโคน (silicone septum) ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้กระบอกฉีด (gas-tight syringe) ดูดแก๊สในช่องว่างเหนือของเหลว (headspace) จำนวน 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาชนิดของกลิ่นเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ได้จากข้อ 4.6.1 โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟซึ่งมีลักษณะดังนี้

แก๊สโครมาโตกราฟ: Shimadzu GC-7AG

คอลัมน์ (packed column): FFAP ร้อยละ 10 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร ทำด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel)

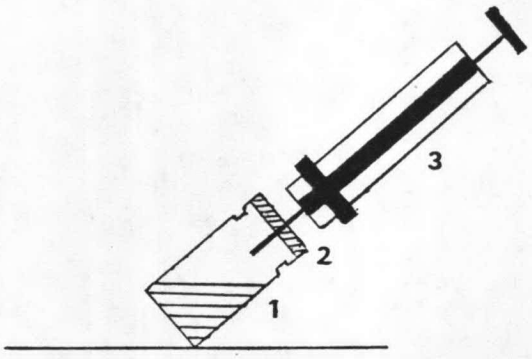
อุณหภูมิของเตาอบ: 60-200 องศาเซลเซียส (3 องศาเซลเซียสต่อนาที)

แก๊สพาหะ: แก๊สไนโตรเจน มีอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจหา: Flame Ionization Detector (FID) ของ Shimadzu C-R1A Chromatopac โดยเครื่องตรวจหามีอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส

Ion source temperature: 180-200 องศาเซลเซียส

การเก็บตัวอย่างโดยใช้กระบอกฉีดดูดแก๊สในช่องว่างเหนือของเหลว แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 การเก็บตัวอย่างโดยใช้กระบอกฉีดดูดแก๊สในช่องว่างเหนือของเหลว

โดย 1 = ขวดบรรจุตัวอย่าง

2 = ฝาปิด (septum)

3 = กระบอกฉีด (gas-tight syringe)

สารมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ชนิดของกลิ่นจำนวน 12 ชนิด สำหรับเปรียบเทียบกับชนิดของกลิ่นในน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้ และตัวอย่างน้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ มีรายละเอียดดังนี้ (Fluka, 1990/91)

(1) Acetaldehyde (CH_3CHO)

มีจุดเดือด 20-21 องศาเซลเซียส

(2) Acetone (CH_3COCH_3)

มีจุดเดือด 55-56 องศาเซลเซียส

(3) n-Butyl alcohol ($CH_3(CH_2)_3OH$)

มีจุดเดือด 116-118 องศาเซลเซียส

(4) Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)

มีจุดเดือด 76-77 องศาเซลเซียส

(5) Ethyl alcohol (CH_3CH_2OH)

มีจุดเดือด 78-80 องศาเซลเซียส

(6) Ethyl formate ($HCOOC_2H_5$)

มีจุดเดือด 52-55 องศาเซลเซียส

(7) Isobutyl alcohol ($(CH_3)_2CHCH_2OH$)

มีจุดเดือด 105-1081 องศาเซลเซียส

(8) Isobutyraldehyde ($(CH_3)_2CHCHO$)

มีจุดเดือด 63-64 องศาเซลเซียส

(9) Methyl acetate (CH_3COOCH_3)

มีจุดเดือด 56-58 องศาเซลเซียส

(10) Methyl alcohol (CH_3OH)

มีจุดเดือด 63-65 องศาเซลเซียส

(11) 2,3-Pentanedione ($CH_3CH_2COCOCH_3$)

มีจุดเดือด 110-115 องศาเซลเซียส

(12) n-Propyl alcohol ($CH_3CH_2CH_2OH$)

มีจุดเดือด 97-98 องศาเซลเซียส

4.6.3 <u>การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส</u>

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้และผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วและน้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ที่เลือกได้จากข้อ 4.6.1 ทำตามวิธีที่กำหนดไว้ใน มอก. 252-2521 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2530) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการทดสอบทั้งหมด 15 คน ตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ความใส กลิ่น รส และสี (organoleptic test) โดยให้คะแนนทุกลักษณะเต็ม 25 คะแนน และแต่ละลักษณะมีช่วงการให้คะแนนดังนี้

0 - 5	ไม่ดี
6 - 10	พอใช้
11 - 15	ดีพอใช้
16 - 20	ดี
21 - 25	ดีมาก

สำหรับลักษณะด้านรส กำหนดให้ผู้ทดสอบตรวจสอบโดยการใช้ไข่ไก่ต้มสุกจิ้มกับผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊ว โดยกำหนดให้

น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้ หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมและผ่านการพาสเจอร์ไรส์

ตัวอย่างที่ 1 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ที่มีปริมาณกรดแลคติกใกล้เคียงกับน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้

ตัวอย่างที่ 2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์น้ำซอสปรุงรสที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ใกล้เคียงกับน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ randomized complete block design (RCBD) ขนาด 3x3x3 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P \leq 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลอง 2 ซ้ำ (ภาคผนวก ค)

ตัวอย่างของแบบทดสอบการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วแสดงในภาคผนวก ข