

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. กุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*) จากตลาดสดหนองมน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี โดยมีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 100-125 ตัวต่อกิโลกรัม
2. เปลือกกุ้งขาว (*Litopenaeus Vannamei*) จากบริษัทสุรพลฟู๊ดส์จำกัด อำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี นำมาล้างทำความสะอาดและคัดแยกเอาเนื้อกุ้ง ส่วนหัว ส่วนขา รวมทั้งสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 75 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บในถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีนมัดปากถุงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องอบแห้ง โดยไอน้ำร้อนยวดยิ่ง (Superheated Steam)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, AC211S, Germany)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, AC2115-00MS, Germany)
4. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) (Eutech Cybernetics, Cyberscan pH1000, Singapore)
5. เครื่องวัดค่าสี (Colorimeter) (Miniscar XL Plus, Hunter Lab, USA)
6. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) (Novasina, S/N9604006, Switzerland)
7. เครื่องวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyser) (Stable Micro System, TA-XT2, USA)
8. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometers) (Spectronic, Genesys 5, USA)
9. เครื่องบดละเอียด (Ultracentrifugal Mill) (Retsch Ultra, ZM 1000, Germany)
10. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Framo-Geraterachnik, M21/1, France)
11. เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher) (MX-T2GN, National, Taiwan)
12. เครื่องผสม (Vortex Mixer) (Relax 2000, Heidolph, Germany)
13. เครื่องกลั่นน้ำบริสุทธิ์ (Elga, Optima Plus 30, USA)
14. เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Audion Elektro, VM 201, Holland)
15. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Mettler, BE 600, Germany)
16. ตู้อบอากาศร้อน (Hot Air Oven) (Shel Lab, 1350FX, USA)

17. ตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ (Laminar Flow Hood) (Hotpack, 527042 S/N 8010467, Great Britain)
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (Heto, CB-22-20-FL, Denmark)
19. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Hirayama, HV-85, Japan)
20. เตาเผา (Muffle Furnace) (Carbolite, RWF 12/23, England)
21. เตาเผาไฟฟ้า (Hot plate)
22. ครุฑชื้บ้ลพร้อมฝา (Crucible)
23. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
24. โถดูดความชื้น (Desiccator)
25. ภาชนะสำหรับหาความชื้น (Moisture Can)
26. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, Whatman International, England)
27. กระดาษกรองเบอร์ 41 (Whatman, Whatman International, England)
28. เครื่องแก้ววัดความหนืด (Cole-Parmer Ubbelohde Viscometer ขนาด 0B) (Type No1., Cannoninstrument Co., USA.)
29. ขวดพลาสติกปากกว้างขนาด 1000 มิลลิลิตร (Plastic Bottle Wide Mouth)
30. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีกเกอร์ ปิเปต บิวเรต ขวดปรับปริมาตร ซ้อนดักสาร หลอดทดลอง

สารเคมี

1. กรดอะซิติก (Acetic Acid; CH_3COOH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid; HCl) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
3. กรดฟอสโฟทังสติก (Phosphotungstic Acid; $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) (AR Grade, Ajax, Australia)
4. กรดไนตริก (Nitric Acid; HNO_3) (AR Grade, BDH, England)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide; NaOH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
6. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride; NaCl) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
7. ไทมอล (Thymol; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$) (AR Grade, Ajax, Australia)

8. โบรมีน (Bromine; Br₂) (AR Grade, Panreac, Spain)
9. แอมโมเนียคลอไรด์ (Ammonia Chloride; NH₄Cl) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
10. แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (Ammonium Thiocyanate; HN₄SCN) (AR Grade, Ajax, Australia)
11. ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver Nitrate; AgNO₃) (AR Grade, BDH, England)
12. สารละลายโพแทสเซียมโพลีไวนิลซัลเฟต (N/400 Potassium Polyvinyl Sulfate; PVSK) (AR Grade, Wako, Japan)
13. แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต (Anhydrous Sodium Sulphate; Na₂SO₄) (AR Grade, Ajax, Australia)
14. เอ็น-บิวทานอล (N-Butanol; C₄H₁₀O) (AR Grade, Ajax, Australia)
15. เอทานอล (Ethanol; C₂H₅OH) (AR Grade, Merck Darmstadt, Germany)
16. โทลูอีน (Toluene; C₇H₈) (AR Grade, BDH, England)
17. โทลูไคอินบลู (Toluidine Blue; (C₁₅H₁₆ClN₃S)₂ ZnClN₂) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
18. เกลือ (Sodium Chloride; NaCl) (Commercial Grade, บริษัทพิพย์, Thailand)
19. 1-N-Hexadecylpyridinium Chloride Monohydrate (CPC; C₂₁H₃₈ClN*H₂O) (AR Grade, Fluka, Switzerland)
20. Ferric Ammonium Sulfate (FeNH₄(SO₄)₂ 12.H₂O) (AR Grade, Fluka, Switzerland)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Peptone Water (AR grade, Criterion, U.S.A)
2. Petrifilm Aerobic Count Plate (AR grade, 3M, Japan)
3. Petrifilm Yeast and Mold Count Plate (AR grade, 3M, Japan)

วิธีดำเนินการวิจัย

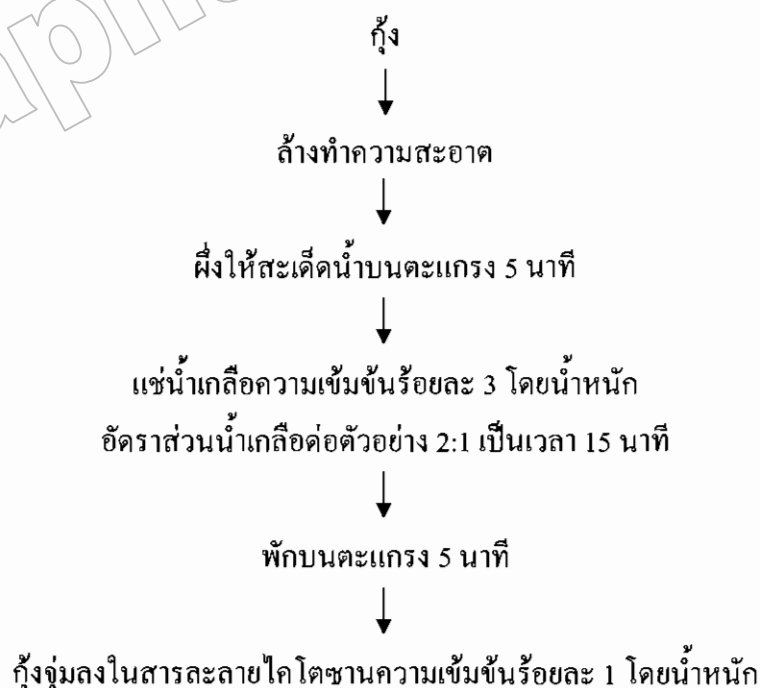
1. การเตรียมวัตถุดิบ

1.1 การเตรียมโคตินและโคโตซาน

เตรียมโคตินและโคโตซานโดยวิธีของนันทียา เจียบแหลม (2548) นำโคโตซานที่เตรียมได้วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ระดับการกำจัดหมู่อะซีติล โดยวิธี Colloid Titration (Toei & Kohara, 1976) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Intrinsic Viscosity (Kasaai, Arul, & Charlet, 2000) โดยโคโตซานที่เตรียมได้มีระดับการกำจัดหมู่อะซีติล และน้ำหนักโมเลกุล แตกต่างกัน 2 ชนิด ที่ได้แก่ ร้อยละ 85.88 ± 4.21 และ $0.96 \times 10^6 \pm 0.12$ คาลตัน และร้อยละ 92.71 ± 0.48 และ $0.28 \times 10^6 \pm 0.06$ คาลตัน

1.2 การเตรียมกึ่งก่อนการอบแห้ง

นำกึ่งมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แคะเปลือก และตัดหัว ผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรงเป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนของน้ำเกลือต่อกึ่งเท่ากับ 2:1 เป็นเวลา 15 นาที นำขึ้นพักบนตะแกรงเป็นเวลา 5 นาที กึ่งจุ่มลงในสารละลายโคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก อัตราส่วนสารละลายโคโตซานต่อกึ่งอย่าง 1:2 เป็นเวลา 1 นาที ผึ่ง 30 นาที ในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) อบแห้งจนกระทั่งความชื้นสุดท้าย 20 ร้อยละมาตรฐานเปียก สรุปลักษณะการเตรียมตัวอย่างกึ่งก่อนการอบแห้งแสดงได้ดังภาพที่ 3-1



อัตราส่วนสารละลายโคโคซานต่อตัวอย่าง 1:2 เป็นเวลา 1 นาที



ผึ่ง 30 นาที ในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)



อบแห้งจนกระทั่งความชื้นสุดท้าย 20 ร้อยละมาตรฐานเปียก

ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างกึ่งก่อนการอบแห้ง

2. ศึกษาผลของโคโคซานและตัวกลางการอบแห้งต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์กึ่งแห้ง

นำกึ่งจุ่มในสารละลายโคโคซานร้อยละ 85.88 ± 4.21 และ $0.96 \times 10^6 \pm 0.12$ คาลตัน และ ร้อยละ 92.71 ± 0.48 และ $0.28 \times 10^6 \pm 0.06$ คาลตัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ครั้ง นาน 1 นาที ผึ่ง 30 นาทีในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง 150 องศาเซลเซียส ความเร็วของตัวกลาง 1.72 เมตรต่อวินาที อบแห้งจนกระทั่งความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 20 ร้อยละมาตรฐานเปียก เก็บตัวอย่างกึ่งแห้งที่ได้จากการทดลองบรรจุในถุงพลาสติก โพลีเอไมด์ที่รีดร่วมกับโพลีเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (PALDPE) ขนาด 15×23 เซนติเมตร บรรจุถุงละ 100 กรัมแบบสุญญากาศด้วยเครื่องปิดผนึกสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติทางจุลินทรีย์ ดังนี้

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ค่าสี ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) การคั่นตัว การหดตัว ค่าความแข็ง ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด กลีเซอ (โซเดียมคลอไรด์) ความเป็นกรดต่าง และปริมาณแอมโมเนีย การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพมีรายละเอียดดังนี้

1. วิเคราะห์ค่าสี วิเคราะห์โดยเครื่องวัดค่าสี (Colorimeter)

(Miniscar XL Plus, Hanter Lab, USA)

2. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น วิเคราะห์โดยตัดแปลงวิธีของ AOAC (2000)

ข้อ 925.10

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) วิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) (Novasina, Switzerland)

4. วิเคราะห์การคั่นตัว วิเคราะห์โดยวิธี Namsanguan et al. (2003)

5. วิเคราะห์การหดตัว วิเคราะห์โดยวิธีของ Nathakaranakul et al. (2007)

6. วิเคราะห์ค่าความแข็ง วิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyser, TA-XT2)
7. วิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด วิเคราะห์โดยวิธี AOAC (2000) ข้อ 938.08
8. วิเคราะห์ปริมาณเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) วิเคราะห์โดยวิธี AOAC (2000) ข้อ 937.09
9. วิเคราะห์ความเป็นกรดค้าง วิเคราะห์โดยเครื่องวัดพีเอช (Cyberscan pH1000, Cybernetics, Eutech, USA)
10. วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย วิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงของ AOAC (2000) ข้อ 973.25

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อรา การศึกษาสมบัติทางจุลินทรีย์มีรายละเอียดดังนี้

1. วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธีของ AOAC (2000) ข้อ 990.12
2. วิเคราะห์เชื้อรา วิเคราะห์โดยวิธีของ AOAC (2000) ข้อ 997.02

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ศึกษาการอบแห้งโดยอากาศร้อนร่วมกันร่วมกับไคโตซาน 2 ชนิด และการอบแห้งโดยไอน้ำร้อนยวดยิ่งร่วมกับไคโตซาน 2 ชนิด โดยมีกึ่งแห้งน้ำเกลือร้อยละ 3 และกึ่งแห้งกรดอะซิติกร้อยละ 1 เป็นตัวควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Technology Services UT Austin, USA)

3. ศึกษาผลของไคโตซานต่ออายุการเก็บผลิตภัณฑ์กึ่งแห้งที่อบแห้งโดยไอน้ำร้อนยวดยิ่ง

นำกึ่งจุ่มในสารละลายไคโตซานร้อยละ 85.88 ± 4.21 และ $0.96 \times 10^6 \pm 0.12$ คาลตัน และ ร้อยละ 92.71 ± 0.48 และ $0.28 \times 10^6 \pm 0.06$ คาลตัน ความเข้มข้นร้อยละ 1 1 ครั้ง นาน 1 นาที ผึ่ง 30 นาที ในตู้กรองอากาศบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง 150 องศาเซลเซียส ความเร็วของตัวกลาง 1.72 เมตรต่อวินาที จนกระทั่งความชื้นสุดท้ายเท่ากับ

20 ร้อยละมาตรฐานเปียก บรรจุในถุงพลาสติกทึบสีดำที่รีดร่วมกับโพลีเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (PA/LDPE) ขนาด 15 × 23 เซนติเมตร ถุงละ 100 กรัม แล้วปิดผนึกด้วยความร้อนเก็บแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างทุก 1 สัปดาห์ วิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติทางจุลินทรีย์ ดังนี้

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ค่าสี ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) การคืนตัว การหดตัว ค่าความแข็ง ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) ความเป็นกรดค้าง และปริมาณแอมโมเนีย การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพมีรายละเอียดดังนี้

1. วิเคราะห์ค่าสี วิเคราะห์ โดยเครื่องวัดค่าสี (Colorimeter) (Miniscar XL Plus, Hanter Lab, USA)
2. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น วิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธีของ AOAC (2000) ข้อ 925.10
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) วิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำในอาหาร (a_w) (Novasina, Switzerland)
4. วิเคราะห์การคืนตัว วิเคราะห์โดยวิธี Namsanguan et al. (2003)
5. วิเคราะห์การหดตัว วิเคราะห์โดยวิธีของ Nathakaranakul et al. (2007)
6. วิเคราะห์ค่าความแข็ง วิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyser, TA-XT2)
7. วิเคราะห์ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด วิเคราะห์โดยวิธี AOAC (2000) ข้อ 938.08
8. วิเคราะห์ปริมาณเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) วิเคราะห์โดยวิธี AOAC (2000) ข้อ 937.09
9. วิเคราะห์ความเป็นกรดค้าง วิเคราะห์โดยเครื่องวัดพีเอช (Cyberscan pH1000, Cybernetics, Eutech, USA)
10. วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย วิเคราะห์โดยวิธีดัดแปลงของ AOAC (2000) ข้อ 973.25

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์

การวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อรา การศึกษาสมบัติทางจุลินทรีย์ มีรายละเอียดดังนี้

1. วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยวิธีของ AOAC (2000) ข้อ 990.12
2. วิเคราะห์เชื้อรา วิเคราะห์โดยวิธีของ AOAC (2000) ข้อ 997.02

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ศึกษาการใช้ไคโตซาน 2 ชนิด ต่ออายุการเก็บที่สัปดาห์ที่ 0-4 โดยมีกุ้งแช่น้ำเกลือร้อยละ 3 และกุ้งแช่กรดอะซิติกร้อยละ 1 เป็นตัวควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เพื่อหาตัวแปรที่มีผลตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Technology Services UT Austin, USA)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation)

วิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) สมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติทางจุลินทรีย์ของกุ้งแห้ง โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Technology Services UT Austin, USA)