บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ผลหม่อน (*Morus alba*) จากไร่ของบริษัทบุญรอดบริวเวอรี่ (สาขาที่ 8) จ.เชียงราย
2. เชื้อยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Fermivin 7013 (DSM Food Specialtics Oenology, France)
3. เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* สายพันธุ์ TISTR 401 ของศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
4. น้ำผึ้งป่าของกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3.1.2 อุปกรณ์

1. ตู้แช่เย็น (Songserm Intercool model SDC-1000AV, Thailand)
2. ตู้แช่เยือกแข็ง (SANYO, Thailand)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (A&D model SK-5001WP, Japan)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Oertling, England)
5. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Memmert model WB10, Germany)
6. เครื่องปั่นตัวอย่างแบบมือถือ (Blender, Moulinex, Spain)
7. เครื่องเขย่า (Heidolph UNIMAX 2010, Germany)
8. ชุดเครื่องแก้ว
9. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Horiba F22, USA)
10. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) (ATAGO, Japan)
11. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer, Dujardin-Salleron, France)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Thermometer, OAKTON, China)
13. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator, Buchi, Japan)
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer model Genesys 10 UV Scanning, USA)
15. เครื่องวัดค่าสี (Chroma meter model CR-400, KONICA MINOLTA, Japan)
16. เครื่องวัดค่า F_0 (Ellab, Denmark)
17. ไมโครปิเปต (Micro pipette, Gilson, France)
18. Glass cuvette
19. ขวดสีชาสำหรับเก็บตัวอย่างขนาด 5 มิลลิเมตร
20. ชุดกรองประกอบด้วยกรวยกรองและเครื่องปั๊มดูดอากาศ (Suction pump)
21. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
22. ผ้าขาวบาง
23. ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
24. แผ่นกรองอากาศ (Syringe filter, Whatman, USA)
25. สายยาง
26. ปั๊มอากาศ (Air pump, General Pet Time, China)

3.1.3 สารเคมี

1. 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, USA)
2. 3,5-Dinitrososalixylic acid (DNS) (Ajax, Australia)
3. Aluminium Chloride ($AlCl_3$) (Ajax, Australia)
4. Citric acid ($C_6H_8O_7$) (APS Finechem, Australia)
5. Di-Ammonium hydrophosphate (DAP) (Merck, England)
6. Ethanol (C_2H_5OH) (Scharlau Chemie SA., Spain)
7. Folin - Ciocalteu' phenol reagent (Fluka, USA)
8. Gallic acid (Fluka, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. Hydrochloric acid (HCl) (JT. Baker, USA)
10. Methanol (CH_3OH) (JT. Baker, USA)
11. Phenolphthalein (Merck, England)
12. Potassium Acetate (CH_3COOK) (Ajax, Australia)
13. Potassium metabisulphite (KMS) (Merck, England)
14. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Merck, England)
15. Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, England)
16. Quercetin (Sigma, Germany)
17. Potato dextrose agar (BD. and Co., USA)
18. Plate count agar (BD. and Co., USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนการผลิตกรดอะซิติก แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ (สุรินทร์, 2548)

ชั่งผลหม่อน และน้ำให้ได้อัตราส่วน เท่ากับ 1 : 1.43

↓

ปั่นด้วยเครื่องปั่น และกรองเอากากออก

↓

ปรับปริมาณกรดซิตริกให้ได้ร้อยละ 0.35

↓

ปรับน้ำหม่อนให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 °Brix

↓

เติม Di-Ammonium hydrophosphate ปริมาณ ร้อยละ 0.03 ของน้ำหม่อน

↓

เติม KMS 0.15 กรัม / 1000 มิลลิลิตร

↓

เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ของปริมาณน้ำหม่อน

(หัวเชื้อเตรียมจากยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Fermivin 7013 ปริมาณ 0.1 กรัม ต่อ น้ำหม่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1000 มิลลิลิตร)

↓

หมักที่อุณหภูมิ29±3.2 องศาเซลเซียสจนได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามที่ต้องการ

ภาพ 3.1 ขั้นตอนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก (มัลลิกาและคณะ, 2551)

นำน้ำหม่อนที่ได้จากขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์มา 600 มิลลิลิตร
ใส่ในฟลาส์กขนาด 1,000 มิลลิลิตร

↓

เติมหัวเชื้อลงไปในน้ำหมักในปริมาณร้อยละ 5 (หัวเชื้อเตรียมโดยนำโคโลนีเดี่ยวของ *Acetobacter aceti* สายพันธุ์ TISTR 401 มา 2 ลูปเพาะในอาหารเหลวตามสูตรในภาคผนวก ก ปริมาณ 100 มิลลิลิตร)

↓

ให้อากาศน้ำหมักโดยใช้ปั๊มอากาศ ตามภาพ 3.3 โดยมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อนาที

↓

ทำการหมักที่อุณหภูมิ 28±2.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันแล้วจึงนำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ผล

ภาพ 3.2 ขั้นตอนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก

ภาพ 3.3 การหมักน้ำผลหม่อนเพื่อให้ได้กรดอะซิติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การวิเคราะห์สารแอนติออกซิแดนซ์และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds) โดย Folin-Ciocalteu's phenol reagent

ปิเปตสารตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในขวดสีชาขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 75 กรัม/ลิตร จำนวน 375 ไมโครลิตรเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol reagent จำนวน 125 ไมโครลิตร เขย่าอีกครั้ง แล้วเติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของ กรดแกลลิก แสดงดังภาพ ก.1 ในภาคผนวก ก

3.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid) โดยวิธีการของ Chang *et al.* (2002)

ปิเปตสารตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดสีชาขนาด 10 มิลลิลิตรเติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น ร้อยละ 10 จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1โมลาร์ จำนวน 100ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของควอเซอติน แสดงดังภาพ ก.2 ในภาคผนวก ก

3.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin) โดยวิธีการของ Ranganna (1977)

นำตัวอย่างมาทำการสกัดกับสารละลายผสมเอทาโนลิก-ไฮโดรคลอลิก (เตรียมจากนำสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ผสมกับสารละลายไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 1.5 N ในอัตราส่วน 85:15) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายผสมเอทาโนลิก-ไฮโดรคลอลิก จนสามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตรได้ บันทึกปริมาณตัวอย่างและสารละลายที่ใช้ในทุกขั้นตอนเพื่อนำไปคำนวณโดยมีวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก

3.2.2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีการของ Manthey (2004)

เติม 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (DPPH 0.0394 กรัม / แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน100 ml) จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมสารตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเจือจาง ความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 10^{-1} – 10^{-4} (7 ความเข้มข้น) เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้คำนวณหาร้อยละของ DPPH radical scavenging activity โดยมีวิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นนำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟในโปรแกรม SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Germany) เพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถลดปริมาณสารอนุมูลอิสระลงได้ร้อยละ 50 (EC_{50})

3.2.3 วิธีการวิจัย แบ่งออกเป็น 5 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาถึงคุณภาพเบื้องต้นของผลหม่อน

นำลูกหม่อนที่ระยะการสุก 2 ระยะคือ ที่ระยะสุกปานกลาง (สีม่วงแดง) (ภาพ 3.4) และที่ระยะสุกจัด (สีม่วงดำ) (ภาพ 3.5) จากไร่ของบริษัทบุญรอดบริวเวอรี่ (สาขาที่ 8) จ.เชียงราย มาทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีของสุทัศน์และคณะ (2550) โดยชั่งตัวอย่างหนักประมาณ 20 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วเติมตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 จำนวน 60 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นให้ละเอียดด้วยชุดปั่นแบบมือถือ แล้วเทลงในขวดรูปชมพู่ที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองแยกเอากากออก แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้ในขวดสีชา ส่วนกากที่ได้นำไปสกัดต่อโดยเติมตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 70 จำนวน 60 มิลลิลิตร นำไปเขย่าอีก 30 นาที กรองแยกเอากากออกอีกครั้ง แล้วเก็บสารละลายที่กรองได้รวมกับสารสกัดที่ได้ในตอนแรก ส่วนกากไปเติมตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 70 อีก 60 มิลลิลิตร เพื่อสกัดรอบสุดท้าย เขย่าต่อเป็นเวลา 30 นาที กรองแยกกากทิ้ง แล้วเก็บสารละลายที่ได้ทั้งหมดรวมกัน บันทึกปริมาตรสารสกัดที่ได้ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ที่ความดัน 50 มิลลิบาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนได้สารสกัดเข้มข้น บันทึกปริมาตรสารสกัดเข้มข้นที่ได้ เก็บสารละลายเข้มข้นที่ได้ในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

คุณภาพทางด้านกายภาพ ได้แก่

- ค่าสีระบบ L* a* b* วัดโดยเครื่องวัดสี (Chroma meter model CR-400, KONICA MINOLTA, Japan)

คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (Horiba F22, USA)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1998)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Japan)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ได้แก่
  - ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Ranganna (1977)
  - ปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการ Folin-Ciocalteu
  - ปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)
  - ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีการของ Manthey (2004)

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) 2 ปัจจัย คือระยะการสุกได้แก่ ลูกหม่อนที่มีระยะสุกปานกลาง (สีม่วงแดง) และที่ระยะสุกจัด (สีม่วงดำ) วิเคราะห์การทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.4 ผลหม่อนที่ระยะสุกปานกลาง (สีม่วงแดง)

ภาพ 3.5 ผลหม่อนที่ระยะสุกจัด (สีม่วงดำ)

ตอนที่ 2 ผลของกระบวนการหมักที่มีต่อปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ในน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ใช้ผลหม่อน ที่ได้จากไร่ของบริษัทบุญรอดบริวเวอรี่ (สาขาที่ 8) จ.เชียงราย มาผ่านกระบวนการหมักสองขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก เป็นการหมักน้ำคั้นจากผลหม่อน ให้ได้แอลกอฮอล์ที่ระดับต่างกัน 3 ระดับ (ร้อยละ 6 ร้อยละ 9 และร้อยละ 12) โดยใช้ยีสต์ผง *Saccharomyces cerevisiae* (Fermivin 7013) ตามวิธีการของสุรินทร์ (2548) ดังภาพ 3.1 ขั้นตอนที่สองเป็น การนำน้ำผลหม่อนที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ระดับ ที่ได้จากการหมักในขั้นตอนแรกมาทำการหมักให้เป็นกรดอะซิติกโดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 401 ดัดแปลงตามวิธีการของมัลลิกา และคณะ (2551) ดังภาพ 3.2 วิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (Horiba F22, USA)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1998)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Japan)
- เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer, Dujardin-Salleron, France)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ได้แก่
  - ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Ranganna (1977)
  - ปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการ Folin-Ciocalteu
  - ปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)
  - ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีการของ Manthey (2004)

ตอนที่ 3 ศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน ในขั้นตอนนี้มีการศึกษาทั้งหมด 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อชนิดของน้ำผลไม้ที่เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ทำการสอบถามผู้บริโภคถึงความต้องการที่มีต่อชนิดของน้ำผลไม้ที่จะใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน โดยมีตัวอย่างแบบสอบถามแสดงในภาคผนวก ก ซึ่งมีการสอบถามถึงข้อมูลทางด้านประชากรศาสตร์ของผู้ตอบแบบสอบถาม ข้อมูลการเลือกชนิดของน้ำผลไม้ 3 ชนิดได้แก่น้ำผลหม่อน น้ำลิ้นจี่ และน้ำเสาวรส โดยน้ำผลไม้ทั้ง 3 ชนิดเป็นน้ำผลไม้ที่มีการผลิตในโรงงานของผู้ประกอบการ จากไร่ของบริษัทบุญรอดบริวเวอรี่ (สาขาที่ 8) จ.เชียงราย อยู่แล้ว สุดท้ายเป็นการสอบถามถึงเหตุผลที่มีอิทธิพลในการตัดสินใจเลือกซื้อเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อนของผู้บริโภค เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ทำการสอบถามผู้บริโภคจำนวน 400 คน ใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบไม่ใช้ทฤษฎีความน่าจะเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(nonprobability sampling) นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

ส่วนที่ 2 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการพัฒนาเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อนผสมน้ำผลไม้

ทำการวัดคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้ในท้องตลาด ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อนจำนวน 10 ตัวอย่าง มีรายชื่อดังนี้

1. น้ำผลหม่อนตราดอยคำ
2. น้ำองุ่นแดงผสม มิกซ์เบอร์รี่ตราแบร์รี่ ซันเบลสท์
3. น้ำรสมัลเบอร์รี่ผสมองุ่นตรา มาลี
4. น้ำผลไม้ผสมทับทิม เบอร์รี่ องุ่น100% ตราชบา
5. น้ำเบอร์รี่มิกซ์ ตรา ทิปโก้
6. น้ำเบอร์รี่รวม 60 % ตรา มาลี
7. น้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำผึ้งป่าและน้ำมะนาว ตราเฮลท์ตี้เมท
8. น้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำผึ้งฟาร์มและน้ำมะนาว ตราเฮลท์ตี้เมท
9. น้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำผึ้งและน้ำมะนาว ตราทิปโก้
10. น้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำทับทิม ตราทิปโก้

นำผลข้อมูลที่ได้(ตาราง 4.8)ไปใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดระดับสูง-ต่ำ ของส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ โดยทำการกำหนดค่าคุณลักษณะของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักที่จะทำการพัฒนาให้มีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับค่าคุณลักษณะสูงสุด และต่ำสุดของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดที่นำมาทำการวัดค่า จากนั้นทำการทดลองสุ่มโดยนำส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักซึ่งประกอบด้วย น้ำส้มสายชูหมักจากผลหม่อน น้ำผลไม้ และสารให้ความหวาน มาทำการผสมกันเพื่อหาว่าจะต้องใช้ปริมาณส่วนผสมแต่ละชนิดเท่าใด จึงจะทำให้เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักมีค่าคุณลักษณะอยู่ในช่วงของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด จากนั้นนำปริมาณส่วนผสมที่ได้ มาทำการศึกษาอัตราส่วนปริมาณส่วนผสมต่างๆ โดยมีข้อกำหนดคือ ใช้น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์เนื่องจากเน้นความมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และปริมาณน้ำส้มสายชูหมักที่ใช้ต้องมีปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละ 50 เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของผลิตภัณฑ์ ทำการกำหนดระดับสูง-ต่ำของส่วนผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่างๆ ดังตาราง 3.1 วางแผนการทดลองแบบ Mixture design แบบ D-Optimal ใช้โปรแกรม Design Expert version 6.0.2 (Statease Inc., Minneapolis, MN)

ตาราง 3.1 ระดับสูง- ต่ำ ของส่วนผสมในการพัฒนาเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ส่วนผสม	ระดับต่ำ	ระดับสูง (หน่วย : ร้อยละ)
น้ำส้มสายชูหมัก	50	70
น้ำผึ้ง	8	15
น้ำผลไม้	15	42

ตาราง 3.2 สิ่งทดลองของการศึกษาสูตรที่เหมาะสมของเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

สูตร	ส่วนประกอบ (ร้อยละ)		
	น้ำส้มสายชูหมัก	น้ำผึ้ง	น้ำผลไม้
1	60	8.00	32.00
2	65	13.25	21.75
3	50	8.00	42.00
4	50	15.00	35.00
5	60	11.50	28.50
6	70	15.00	15.00
7	70	8.00	22.00
8	55	11.50	33.50
9	50	15.00	35.00
10	70	8.00	22.00

กำหนดสูตรตามเงื่อนไขที่กำหนด จะได้สูตรผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 10 สูตร ที่มีจุดซ้ำ 2 จุด ที่จุดศูนย์กลาง ดังแสดงในตาราง 3.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทุกสูตรนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี และทางด้านประสาทสัมผัส ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (Horiba F22, USA)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Japan)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ได้แก่
  - ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Ranganna (1977)
  - ปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการ Folin-Ciocalteu

คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

ใช้วิธีการให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 (9-point hedonic scale) (Peryam and Pilgrim, 1957) ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการทางประสาทสัมผัสของภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทดสอบกับผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 60 คน ผู้ทดสอบกลุ่มเป้าหมาย คือ นักศึกษาภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีตัวอย่างแบบสอบถาม ดังแสดงในภาคผนวก ข ทำการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ทดสอบชิมโดยเสิร์ฟตัวอย่างในถ้วยชิมขนาดเล็ก ตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร กำหนดรหัสเลขสุ่มสามตัวติดที่ข้างแก้ว เสิร์ฟตัวอย่างทีละตัวอย่างแบบสุ่ม ในระหว่างการทดสอบชิม ให้ผู้ทดสอบดื่มน้ำระหว่างการทดสอบตัวอย่างถัดไปทุกครั้ง เมื่อทำการทดสอบเสร็จแล้ว ผู้ทดสอบจะได้รับของที่ระลึกตอบแทนในการทดสอบ ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์หาช่วงของสูตรที่เหมาะสม (optimization) ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (RSM) โดยใช้โปรแกรม Design-expert version 6.0.10 (StateaseInc., USA) โดยมีค่าที่ใช้ในการคัดเลือกระดับ ของส่วนผสมที่เหมาะสม ในการพัฒนาเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน คือ ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ และคะแนนการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านต่างๆ อย่างน้อย 5.5 คะแนน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 4 ศึกษากระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

ศึกษาหาระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ 2 วิธีคือ แบบบรรจุขณะร้อน (hot fill) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และแบบพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิการฆ่าเชื้อที่ 80 85 และ 90 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ โดยทำการหาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อโดยใช้อุปกรณ์วัดค่า F_0 (Ellab, Denmark) และกำหนดค่า $D_{75^{\circ}c}$ เท่ากับ 1.50 ซึ่งเป็นค่าอ้างอิงที่ใช้ในการทำลายยีสต์ *Candida pelliculosa* ที่ทำให้น้ำผลไม้เกิดการเน่าเสีย (Tchango *et al.*, 1997) ทำการผสมเครื่องดื่มให้มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเครื่องดื่มบรรจุขวดแก้วทรงกระบอกเป็นจำนวน 180 มิลลิลิตร ก่อนทำการฆ่าเชื้อ ตามวิธีในตาราง 3.3 และวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (Horiba F22, USA)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Japan)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ได้แก่
  - ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Ranganna (1977)
  - ปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการ Folin-Ciocalteu
  - ปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)
  - ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีการของ Manthey (2004)

คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (1998)
- ยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (1998)

ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 การทดลอง วิเคราะห์การทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยวัดค่าตัวอย่างที่วันที่ 0 และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน นำข้อมูลที่ได้ไปทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ตาราง 3.3 สภาวะการฆ่าเชื้อในเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน

การทดลอง	กระบวนการ
1	การทดลองควบคุม
2	พาสเจอร์ไรซ์ที่ 80 °C
3	พาสเจอร์ไรซ์ที่ 85 °C
4	พาสเจอร์ไรซ์ที่ 90 °C
5	บรรจุร้อน (Hot fill) ที่ 85 °C

ตอนที่ 5 การวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำผลหม่อน ที่ผ่านการพัฒนาตามสูตร และกระบวนการผลิตที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆ ดังกล่าว จะถูกนำมาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

คุณภาพทางด้านกายภาพ ได้แก่

- ค่าสีระบบ L* a* b* วัดโดยเครื่องวัดสี (Chroma meter model CR-400, KONICA MINOLTA, Japan)

คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (Horiba F22, USA)
- ปริมาณความเป็นกรดทั้งหมด (total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1998)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Japan)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Lane and Eynon method (สุทัศน์, 2549)
- ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Ranganna (1977)
- ปริมาณ สารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการ Folin-Ciocalteu
- ปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด วิเคราะห์โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chang *et al.* (2002)
- ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH ดัดแปลงตามวิธีการของ Manthey (2004)

คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (1998)
- ยีสต์และรา ตามวิธีของ AOAC (1998)

คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

ทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์สุดท้ายของผู้บริโภค จำนวน 100 คน ทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ โดยการให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 9 (9-point hedonic scale) (Peryam and Pilgrim, 1957) ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการทางประสาทสัมผัสของภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยผู้ทดสอบชิมประกอบไปด้วยนักศึกษา บุคลากรของคณะอุตสาหกรรมเกษตร และนักเรียนจากโรงเรียนต่างๆที่มาศึกษาดูงาน ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ ของตัวอย่างที่ผ่านการพัฒนาแล้ว และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดที่มีในท้องตลาด 3 ชนิดคือ น้ำผลหม่อนตราดอยคำ น้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำผึ้งป่า และน้ำมะนาวตราทิปโก้ และน้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์ผสมน้ำผึ้งป่า และน้ำมะนาวตราเฮลท์ตี้เมท เพื่อเป็นการเปรียบเทียบถึงปริมาณ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved