บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) พันธุ์เชียงใหม่ จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่

3.2 สารเคมี

1. เอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (Pectinex Ultra SP-L) ; Food grade (Novozymes, Denmark) (ภาคผนวก ฉ)
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์
   - Acetronitrile (Merck, Germany)
   - Beta carotene (Sigma, Germany)
   - Chloroform (Carlo, Italy)
   - Copper sulphate (Merck, Germany)
   - Ethanol (Merck, Germany)
   - Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)
   - Formic acid (Merck, Germany)
   - Gallic acid (Carlo, Italy)
   - Hydrochloric acid (Merck, Germany)
   - Linoleic acid (Sigma, Germany)
   - Phenolphthalein (May & Baker, England)
   - Potassium hydrogen phthalate (Merck, Germany)
   - Potassium iodide (Ajex, Australia)
   - Sodium hydroxide (Merck, Germany)
   - Sodium potassium tartrate (Merck, Germany)
   - Sodium carbonate (Merck, Germany)
   - Sodium thiosulphate (Ajex, Australia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Soluble starch (Fisher Scientific, UK)
- Sulfuric acid (Merck, Germany)
- Tween 40 (Sigma, Spain)
- 2,2- diphenyl-l-picrylhydrazyl, DPPH (Sigma, USA)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อยีสต์และรา
   - Plate count agar (Merck, Germany)
   - Potato dextrose agar (Merck, Germany)
   - Peptone water (Merck, Germany)
   - Tartaric acid (Merck, Germany)

3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. เครื่องทำไอศกรีมทรงกระบอกปริมาตร 20 ลิตร (Ice stars PS/36: 220V Marchcool Ltd., Thailand) (ภาพที่ ก.2)
2. เครื่องเหวี่ยงแยกแบบตะกร้า (Marchcool Ltd., Thailand) (ภาพที่ ก.3)
3. เครื่องปั่นผลไม้ (Sharp: Model EM-11, Japan) (ภาพที่ ก.4)
4. เครื่องคั้นน้ำแบบไฮดรอลิก (Sakaya : Model M310RZ, Thailand) (ภาพที่ ก.5)
5. เครื่องสกัดน้ำผลไม้แบบแยกกาก (National : Model MJ-68 M, Taiwan)
6. ถุงผ้าสำหรับอัดไฮดรอลิก (Sakaya, Thailand)
7. เครื่องชั่งดิจิตอล (Tanita: Model KD-200, China)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus: Model TS2KS, USA)
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AND: Model HR-200, Japan)
10. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ขนาด 0-32 และ 28-62 °Brix (ATAGO: Model N-2E, Japan)
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด- ด่าง (Cyber: Model scan-510, Singapore)
12. เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter : Model CR-300, Japan)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Perkin Elmer : Model Lambda 12, Germany)
14. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu: Model LC-20A, Japan)
15. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield-Programmable Viscometer: Model LVDV-II+, Germany)
16. เตาให้ความร้อน (Favorit: Model 65A-68A, Malaysia)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

17. ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)

18. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Model Z 200 A , Germany)

19. เครื่องผสม (Model Genie 2, USA)

20. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert: Model WB14, Germany)

21. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

22. ไมโครปิเปต (Biohit PLC, Finland)

23. โถดูดความชื้น (desicators) และกระป๋องอบความชื้น (moisture can)

24. ชุดเครื่องมือ และอุปกรณ์วิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

25. ชุดเครื่องมือไทเทรต

26. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปิเปต กรวยแก้ว ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคน ถังพลาสติก กะละมัง ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม

3.4 วิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการสกัดน้ำหม่อนจากผลหม่อนสุกสด (สีม่วงดำทั้งผล) พันธุ์เชียงใหม่ โดยมีการเปรียบเทียบวิธีการคั้นแบบต่างๆ และการใช้เอนไซม์ในการสกัดน้ำหม่อนโดยใช้ผลหม่อนแช่แข็ง จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เข้มข้นโดยเทคนิคการทำให้เข้มข้นแบบแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นนำน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นที่ได้ไปศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ของผลิตภัณฑ์น้ำหม่อนสกัดเข้มข้นใน ระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาวิจัย ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดน้ำหม่อน

นำผลหม่อนสดมาสกัดน้ำโดยใช้วิธีการสกัด 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ปั่นผลหม่อนด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า

กรรมวิธีที่ 2 ปั่นผลหม่อนด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) หลังจากนั้นนำไปบีบอัดด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบไฮดรอลิก

กรรมวิธีที่ 3 สกัดน้ำหม่อนโดยใช้เครื่องสกัดน้ำผลไม้แบบแยกกาก

จากวิธีการสกัดทั้ง 3 กรรมวิธี ทำวิธีละ 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DNMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ผลการสกัด ดังนี้

- ปริมาณผลผลิต (ร้อยละ) = $\frac{\text{น้ำหม่อนที่ได้ (kg)}}{\text{น้ำหนักผลหม่อน (kg)}} \times 100$

- ปริมาณกาก (ร้อยละ) = $\frac{\text{กากหม่อนที่ได้ (kg)}}{\text{น้ำหนักผลหม่อน (kg)}} \times 100$

- ปริมาณที่สูญเสีย (ร้อยละ) = $\frac{\text{ปริมาณที่สูญเสีย (kg)}}{\text{น้ำหนักผลหม่อน (kg)}} \times 100$

- ปริมาณความชื้นของกาก โดยการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- ปริมาณสารแขวนลอยในน้ำหม่อนที่สกัดได้ นำน้ำหม่อนที่สกัดได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงแยกส่วนใส ชั่งตะกอนที่ตกค้างคำนวณค่าเป็นร้อยละ

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์เพคติเนสในการสกัดน้ำหม่อน

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์เพคติเนสในการสกัดน้ำหม่อน โดยการใช้ผลหม่อนแช่แข็ง มีการศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่หนึ่งเป็นความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0.00 0.05 0.10 และ 0.15 ของน้ำหนักผลหม่อนบด ปัจจัยที่สองเป็นเวลาที่ใช้ในการย่อย 3 ระดับ คือ 3 6 และ 9 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในการทดลองใช้ผลหม่อนปั่น 1000 กรัม เติมเอนไซม์เพคติเนสตามความเข้มข้นที่กำหนด จนครบระยะเวลาในการย่อย หลังจากนั้นทำการแยกน้ำหม่อนตามวิธีที่คัดเลือก ไว้จากขั้นตอนที่ 1 วิเคราะห์ผลการสกัดเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ 4×3 Factorial in CRD วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) จำนวน 3 ซ้ำ

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำให้เข้มข้นโดยเทคนิคการทำให้เข้มข้นแบบแช่เยือกแข็ง

นำน้ำหม่อนที่สกัดได้ ปริมาณ 10 กิโลกรัม ใส่ในเครื่องทำผลึกน้ำแข็ง โดยการแช่เยือกแข็งแบบมีการกวนโดยใช้การหมุนใบพัด ศึกษาระยะเวลาในการทำให้น้ำหม่อนมีลักษณะเป็นกึ่งของเหลวและของแข็งที่เหมาะสม โดยใช้เวลาในการสร้างผลึกน้ำแข็งที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 15 20 25 30 และ 35 นาที จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นจึงนำไปแยกผลึกน้ำแข็ง ออกจากของเหลวด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า หลังจากนั้นนำน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นที่ได้ไปสร้างผลึกน้ำแข็งพอครบเวลาที่กำหนดไว้จึงนำไปแยกผลึกน้ำแข็งออกจากของเหลว เป็นจำนวน 3 รอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำตัวอย่างน้ำหม่อนเข้มข้นที่ได้แต่ละรอบตรวจวัดคุณภาพต่างๆ ดังนี้

- ปริมาณน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นที่ได้ (ร้อยละ)
- ปริมาณผลึกน้ำแข็งที่แยกได้ (ร้อยละ)
- ปริมาณที่สูญเสียของน้ำหม่อนสกัดเข้มข้น (ร้อยละ)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำหม่อนที่สกัดได้ และผลึกน้ำแข็งที่แยกได้ โดยใช้ Hand refractometer (AOAC, 2000)

หลังจากนั้นเลือกระยะเวลาในการสร้างผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำเข้มข้น และปริมาณน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นที่ได้ ในสัดส่วนระหว่างปริมาณน้ำเข้มข้นและผลึกน้ำแข็งที่แยกได้ จากการแช่เยือกแข็งในแต่ละรอบ พอครบเวลาที่เลือกไว้จึงนำ ไปแยกผลึกน้ำแข็งออกจากของเหลว เป็นจำนวน 3 รอบ นำตัวอย่างน้ำหม่อนเข้มข้นที่ได้แต่ละรอบตรวจวัดคุณภาพต่างๆ ดังนี้

- ปริมาณน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นที่ได้ (ร้อยละ)
- ปริมาณผลึกน้ำแข็งที่แยกได้ (ร้อยละ)
- ปริมาณที่สูญเสียของน้ำหม่อนสกัดเข้มข้น (ร้อยละ)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำหม่อนที่สกัดได้ และผลึกน้ำแข็งที่แยกได้ โดยใช้ Hand refractometer (AOAC, 2000)
- ค่าสี โดยวัดค่า L*, C* และ h ด้วยเครื่อง Minolta chroma meter
- วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) (AOAC,2000)
- ค่าความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield-Programmable Viscometer รุ่น LVDV-II+
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Rebelein Method (Iland *et al.,* 2000)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Waterman and Mole, 1994)
- ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (Ranganna, 1986)
- ปริมาณสารเคอร์ซีทิน โดยใช้เครื่อง HPLC (Fecka and Turek, 2008)
- ดัชนีสารแอนติออกซิแดนต์ โดยวัดอัตราการฟอกสีของสารเบต้าแคโรทีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (Patricia and Dan, 1978)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging (Yen and Hsieh, 1997)

วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จำนวน 3 ซ้ำ

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมของน้ำหม่อนสกัดเข้มข้น

นำน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นโดยเทคนิคการทำให้เข้มข้นแบบแช่เยือกแข็ง บรรจุลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วนำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 4 และ 6 นาที (สงกรานต์, 2551) ครบเวลาแล้วทำให้เย็นโดยการหล่อเย็น ตรวจวัดคุณภาพทางกายภาพ เคมี เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3 และตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ ดังนี้

- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001)
- ปริมาณเชื้อยีสต์และรา (BAM, 2001)

จากนั้นเลือกระยะเวลาในการต้มฆ่าเชื้อที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุข เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 214) (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543)

วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จำนวน 3 ซ้ำ

ขั้นตอนที่ 5 ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภค

นำน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นโดยเทคนิคการทำให้เข้มข้นแบบแช่เยือกแข็งที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 4 มาทดสอบการยอมรับผู้บริโภค ประเมินผลทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ความกลมกล่อม ความข้นหนืด ความชอบโดยรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ 9-Point hedonic scale จำนวนผู้ทดสอบชิม 150 คน

ขั้นตอนที่ 6 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำหม่อนสกัดเข้มข้น

นำน้ำหม่อนเข้มข้นโดยเทคนิคการทำให้เข้มข้นแบบแช่เยือกแข็ง ที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 4 นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 เดือน ทำการสุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ทุก 1 เดือน โดยพิจารณาจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นไปตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุข เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 214) (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543) วิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved