

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุประสงค์

ผลหม่อนห้าม (สีแดงร้อยละ 50 และสีม่วงดำร้อยละ 50) และผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) พันธุ์เชียงใหม่ จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่

3.2 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

- กรดซिटริก (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- แคลเซียมคลอไรด์ (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- ไคโตซาน (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- ไคโตซานทางการค้า (เบนเฟ็ด) (บริษัท ไบโอเซฟเฟอร์ จำกัด, ประเทศไทย)
- เจลาติน (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- โปแทสเซียมซอร์เบท (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- โปแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- เมทิลพาราเบน (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- วุ้น (agar) (บริษัท ยูเนียนชาयน์ จำกัด, ประเทศไทย)
- กรดเปอร์แอสซิดิก
- 2,6-Dichlorophenol-Indophenol (Sigma, USA)
- Anhydrous sodium carbonate (Merck, Germany)
- Boric acid (Merck, Germany)
- Bromocresol green (Merck, Germany)
- Copper sulphate (Merck, Germany)
- Ethanol (Merck, Germany)
- Methyl red (Merck, Germany)
- Oxalic acid (Merck, Germany)

- Petroleum ether (Merck, Germany)
- Phenolphthalein indicator (Beaker, England)
- Potassium iodide (Merck, Germany)
- Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- Sodium potassium tartate (Merck, Germany)
- Sodium thiosulphate (Merck, Germany)
- Soluble starch (Fisher Scientific, England)
- Standard ascorbic acid (Sigma, USA)
- Sulfuric acid (Merck, Germany)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรา

- Plate count agar (Merck, Germany)
- Potato dextrose agar (Merck, Germany)
- Peptone water (Merck, Germany)
- Tartaric acid (Merck, Germany)

3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- ถาดโพลี ขนาด 15 x 21 เซนติเมตร (บริษัท พี. พี. แพคเกจจิง จำกัด, ประเทศไทย)
- ฟิล์มหดพอลิไวนิลคลอไรด์ ความหนา 12 ไมโครเมตร (บริษัท ควิกแพค แปซิฟิก จำกัด, ประเทศไทย)
- พลาสติกกันกระแทกขนาด 1x1 เมตร (บริษัท นอร์ทท็อปปไทย จำกัด, ประเทศไทย)
- กล้องโพลีมีฝาปิด ขนาด 25 กิโลกรัม (บริษัท พี. พี. แพคเกจจิง จำกัด, ประเทศไทย)
- เครื่องปั่นผลไม้ (National รุ่น MX-T31 GN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (AND HR-200, Japan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Ohaus TS 2 KS, USA)
- เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร (Texture Analyzer TA-XTi plus, England)
- เครื่องวัดสี (chroma meter, Minolta, CR-300, Japan)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) : Cyber Scan-510, Singapore)

- เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Agilent GC 6820, England)
- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC : Shimadzu LC-20A, Japan)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer : Perkin Elmer-Lambda 12, Germany)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ขนาด 0-32 องศาบริกซ์ (ATAGO: Model N-2E, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Mettler, Germany)
- เต้าเผาไฟฟ้า (Carbolite, England)
- เต้าให้ความร้อน (Favorit: Model 65A-68A, Malaysia)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler: Model WB14, Germany)
- ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ (Sanyo 5820, Japan)
- โถดูดความชื้น (desiccators) และกระป๋องอบความชื้น (moisture can)
- เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
- ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
- ห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- หลอดย่อย และชุดย่อยโปรตีน
- เครื่องมือไตเตรต
- ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
- กล่องพลาสติกมีฝาปิด และเซปตัม
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ทัพพี ผ้าขาวบาง ปิเปต ปีกเกอร์ กรวยกรอง แท่งแก้วคน

ขวดวัดปริมาตร ซ้อนตักสาร กระจกตวง ขวดรูปชมพู่ ขวดก้นกลม กระจกกรอง ตะกร้าพลาสติก กะละมังพลาสติก ถาดพลาสติก ถุงพลาสติก ขางรัด กล่องโฟม ถุงมือยาง และอุปกรณ์ทดสอบชิม

3.4 วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการยืดอายุการเก็บรักษาหม่อนผลสดหลายวิธีร่วมกัน โดยใช้หม่อนสุกพันธุ์เชียงใหม่ 2 ระยะความสุก ได้แก่ ผลหม่อนห่าม (สีแดงร้อยละ 50 และสีม่วงดำร้อยละ 50) และผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) นำไปศึกษาคุณภาพทางกายภาพ เคมี และชีวเคมี จากนั้นศึกษาการเพิ่มความแข็งของผล การใช้สารเคมีชะลอการเน่าเสีย หลังจากนั้นศึกษาชนิดของวัสดุรองรับที่เหมาะสม รวมทั้งการทดสอบวิธีการที่ได้ในสภาพการใช้งานจริง ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษา ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาลักษณะคุณภาพทางกายภาพ เคมี และชีวเคมี ของหม่อนผลสด

นำหม่อนผลสุกพันธุ์เชียงใหม่ ที่ปลูกในแปลงของศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่ มาแบ่งตามความสุกโดยการสังเกตผลหม่อนด้วยสายตา ได้แก่ ผลหม่อนห่าม (สีแดงร้อยละ 50 และสีม่วงดำร้อยละ 50) และผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) จากนั้นนำไปตรวจคุณภาพต่างๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ (ภาคผนวก จ) ดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสีระบบ L* a* และ b* โดยเครื่องวัดสี Chroma meter (Minolta, CR 300, Minota Camera CO., Ltd., Japan)
- แรงตัดผลหม่อนให้ขาด โดยเครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร (Texture Analyzer, TA. XTi plus, UK) ใช้หัวรูปใบมีดตรง (Probe HDP/ BSK Knife) วัดค่าแรงตัดให้ขาดของตัวอย่างผลหม่อน โดยใช้ตัวอย่าง 10 ผลต่อ 1 ซ้ำ ทำการวัด 3 ซ้ำ ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น นิวตัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน (proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยหยาบ และคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2000)
- ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปของกรดซิตริก) (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยเครื่อง hand refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการของ Iland *et al.* (2000)
- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด โดยวิธี Folin – Ciocalte วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (Waterman and Mole, 1994)
- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (Ranganna, 1986)
- ปริมาณเคอร์ซีทิน โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Fecka and Turek, 2008)
- คัชนีแอนติออกซิแดนซ์ โดยวัดอัตราการฟอกสีของสารเบต้าแคโรทีน ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Patricia and Dan, 1978)
- ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยวิธี DPPH radical - scavenging (Yen and Hsieh, 1997)

การวิเคราะห์คุณภาพทางชีวเคมี

วัดอัตราการหายใจของผลหม่อน โดยนำผลหม่อนสดทั้ง 2 ระยะความสุก ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (31±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส) ใส่กล่องพลาสติกที่มีปริมาตร 1 ลิตร และปิดฝาให้สนิทเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากเพลินพิศ, 2548) หลังจากนั้นนำไปวัดอัตราการหายใจโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ยี่ห้อ Agilent GC รุ่น 6820 โดยคำนวณในรูปของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/กิโลกรัมผลหม่อนต่อชั่วโมง (ภาคผนวก จ)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพิ่มความแข็งของเนื้อหม่อนผลสด

นำผลหม่อนห้าม และผลสุก ไปแช่สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 1.0 นาน 5 นาที (ดัดแปลงจาก Fusheng *et al.*, 2011) แล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำ หลังจากนั้นจึงนำไปวัดแรงตัดผลหม่อนให้ขาด ด้วยเครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารตามการทดลองที่ 1 ทำการวัด 3 ซ้ำ ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น นิวตัน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การทดลองที่ 3 ศึกษาสารที่เหมาะสมในการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นของหม่อนผลสด

นำผลหม่อนห้าม และผลสุก ไปแช่ในสารละลายต่างๆ ตามวิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 ผลหม่อนแช่ในสารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ผสมกับกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.10

วิธีการที่ 2 ผลหม่อนแช่ในสารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ผสมกับกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.10

วิธีการที่ 3 ผลหม่อนแช่ในสารละลายกรดเปอร์แอกซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 0.01

วิธีการที่ 4 ผลหม่อนแช่ในสารละลายกรดเปอร์แอกซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 0.02

นำผลหม่อนไปแช่สารละลายต่าง ๆ นาน 5 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และราตามวิธี BAM (2001) เปรียบเทียบกับผลหม่อนที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535)

การทดลองที่ 4 ศึกษาสารที่เหมาะสมในการเคลือบผิวผลหม่อน

นำผลหม่อนห้าม และผลสุก ไปจุ่มเคลือบด้วยสารละลายต่างๆ ตามวิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 เคลือบผิวผลหม่อนด้วยไคโตซานความเข้มข้นร้อยละ 1.0

วิธีการที่ 2 เคลือบผิวผลหม่อนด้วยเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 1.0

วิธีการที่ 3 เคลือบผิวผลหม่อนด้วยวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 1.0

วิธีการที่ 4 เคลือบผิวผลหม่อนด้วยไคโตซานทางการค้า (Benefit) ความเข้มข้นร้อยละ 5.0

เตรียมจาก เบนเฟิตเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก (ภาคผนวก ข)

นำผลหม่อนไปจุ่มเคลือบสารละลายต่างๆ นาน 5 นาที (ตัดแปลงจาก อภิตา และคณะ, 2551 และณภัทร, 2548) แล้วยกขึ้นผึ่งให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบจากน้อยไปมาก เป็นคะแนน 1-9 ตามวิธีของ Hedonic Scale 9 Point เปรียบเทียบกับผลหม่อนที่ไม่ได้เคลือบผิว ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ส่วนที่ 2 นำไปบรรจุในภาชนะโฟม หุ้มด้วยฟิล์มหดรพอลิไวนิลคลอไรด์ความหนา 12 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 88 ± 2 เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นทำการคัดเลือกสารเคลือบผิวที่เหมาะสมเพียงชนิดเดียว โดยพิจารณาผลการทดสอบชิม ร่วมกับการสูญเสียน้ำหนักของผลหม่อนในระหว่างการเก็บรักษา วางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 3 ซ้ำ

การทดลองที่ 5 ศึกษาการใช้สารเคลือบผิวหม่อนผลสดร่วมกับสารเคมีชะลอการเน่าเสีย

เมื่อได้ชนิดของสารลดจำนวนจุลินทรีย์และสารเคลือบผิวผลหม่อนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3 และ 4 จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาศึกษาต่อโดยนำผลหม่อนห้าม และผลสุก ไปจุ่มเคลือบ โดยใช้สารเคลือบผิวที่เหมาะสมได้จากการทดลองที่ 4 ซึ่งมีการผสมสารชะลอการเน่าเสีย 2 ชนิดที่แตกต่างกันคือ โพแทสเซียมซอร์เบต และเมทิลพาราเบน ตามวิธีการดังนี้

วิธีการที่ 1 แช่ผลหม่อนในสารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ผสมกับกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.10 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.0 นาน 5 นาที แล้วแช่ผลหม่อนในสารละลายไคโตซานทางการค้า (Benefit) ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 ผสมกับ โพแทสเซียมซอร์เบตเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 5 นาที

วิธีการที่ 2 แซ่ผลหม่อนในสารละลายโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ผสมกับกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.10 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.0 นาน 5 นาที แล้วแช่ผลหม่อนในสารละลายโคโคซานทางการค้า (Benefit) ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 ผสมกับเมทิลพาราเบนเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 5 นาที

หลังจากนั้นจึงให้สะเด็ดน้ำ บรรจุผลหม่อน และเก็บรักษาตามการทดลองที่ 4 ทำการสุ่มตัวอย่างวิเคราะห์คุณภาพในระหว่างการเก็บรักษาดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ แรงตัดผลหม่อนให้ขาด ค่าสี ตามการทดลองที่ 1 และการสูญเสียน้ำหนักระหว่างการเก็บรักษา ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 2 วัน

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ตามการทดลองที่ 1 ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 2 วัน

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ตามการทดลองที่ 3 ทำการวิเคราะห์ในวันแรก และวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่เริ่มเน่าเสีย โดยพิจารณาจากการตรวจพินิจ) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535)

การทดลองที่ 6 ชนิดของวัสดุรองรับที่เหมาะสมในการบรรจุหม่อนผลสดเพื่อการขนส่ง
นำผลหม่อนห้าม และผลสุก เตรียมโดยใช้สภาวะการเตรียมที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 5 จากนั้นบรรจุผลหม่อนที่ได้ลงบนถาดโฟมซึ่งรองรับด้วยวัสดุรองรับ 2 แบบ ได้แก่ ใบหม่อนสด และแผ่นพลาสติกกันกระแทก เปรียบเทียบกับการบรรจุโดยไม่ใช้วัสดุรองรับ หุ้มถาดด้วยฟิล์มหดรพอลิไวนิลคลอไรด์ แล้วขนส่งจากแหล่งปลูกหม่อนของเกษตรกรบ้านขุนกลาง ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้รถกระบะในการขนส่ง ซึ่งมีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,200 เมตร และห่างจากตัวเมืองเชียงใหม่ประมาณ 85 กิโลเมตร มาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นประเมินคุณภาพภายหลังการขนส่ง ได้แก่ จำนวนผลที่มีคุณภาพดี จำนวนผลที่ผิวฉ่ำ จำนวนผลที่ช้ำ และจำนวนผลที่เสก คิดเป็นร้อยละ โดยปริมาณผล เปรียบเทียบกับผลหม่อนที่บรรจุถาดโฟมโดยไม่ใช้วัสดุรองรับ เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุรองรับที่เหมาะสมในการบรรจุผลหม่อนแล้วศึกษาขั้นต่อไป

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535) จำนวน 4 ซ้ำ

การทดลองที่ 7 ทดสอบวิธีการที่ได้ในสภาพการใช้งานจริง

นำผลหม่อนห่าม และผลสุกไปทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานจริง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 ถึง 6 โดยขนส่งตามวิธีการในทดลองที่ 6 มาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพของผลหม่อนในวันแรก และวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (วันที่เริ่มเน่าเสีย) ดังนี้

- คุณภาพทางกายภาพ และเคมีของผลหม่อน ตามการทดลองที่ 1
- คุณค่าทางโภชนาการของผลหม่อน ได้แก่ วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง วิตามินซี เหล็ก ฟอสฟอรัส แคลเซียม และโพแทสเซียม โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (AOAC, 2000)
- คุณภาพด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และและปริมาณยีสต์และรา ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535)