บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

- เครื่องแปรรูปอาหารโดยใช้ความดันสูงยิ่ง (Food-lab, England)
- เครื่องแยกกาก (Moulinex A753, UK)
- เครื่องวัดอุณหภูมิ (Extech instruments 421305, Taiwan)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Atago/N-1E, USA)
- เครื่องวัดสี (HunterLab, Model Color Quest XE, USA)
- เครื่องวิเคราะห์ความเป็นกรดด่าง (Satorius PB-20, Germany)
- เครื่อง Spectrophotometer (Perkin Elmer instruments, Model Lambda 35)
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (HF-3000G, Switzerland)
- เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius A120S, Germany)
- Auto pipet (Eppendorf, Reference Series 2000, Canada)
- เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich Zentrifuge Universal, Model Mikro22R, Germany)
- หม้อนึ่งอัดไอ (Airayama HA-300MIV, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Gallenkamp, England)
- ตู้บ่ม (Heraeus B6200, England)
- เครื่องผสม (Scientific Industries G-560E, U.S.A.)

3.2 สารเคมี

- โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$)
- สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4 และ pH 7
- Folin-Ciocalteu phenol reagent
- Aqueous sodium carbonate
- Calcium carbonate ($CaCO_3$)
- Gallic acid
- Acetone

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- กรดทาร์ทาริก (L(+)-Tartaric acid)
- Ethyl alcohol
- อาหารสำเร็จรูป PCA (Plate Count agar)
- อาหารสำเร็จรูป PDA (Potato Dextrose agar)
- Peptone Water (buffered)

3.3 การเตรียมน้ำใบบัวบก

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือบัวบก โดยมีแหล่งที่มาจากตลาดต้นพยอม จ.เชียงใหม่ นำมาเลือกตัดเอาเฉพาะส่วนใบและก้านประมาณ 1 kg ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง และล้างด้วย สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 300 ppm 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 1 ครั้ง ปั่นแยกกากโดยใช้เครื่องแยกกาก นำส่วนที่เป็นน้ำประมาณ 300 ml มาผสมด้วยน้ำสะอาดประมาณ 300 ml (อัตราส่วน 1:1) ที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100°C และทิ้งไว้ให้เย็น ผสมกับน้ำตาลทรายขาวให้มีความหวานสุดท้ายเป็น 14°Brix แบ่งเป็น 2ส่วน ส่วนที่หนึ่ง นำมาบรรจุในถุงร้อนแบบหนา ขนาด 3x15 cm^2 ปริมาตรถุงละ 50 ml โดยทำการรีดไล่อากาศในถุงออก ปิดผนึกด้วยความร้อน บรรจุในถุงร้อนแบบหนาที่มีน้ำสะอาดบรรจุอยู่ แล้วทำการรีดไล่อากาศออก ปิดผนึก ก่อนนำไปแปรรูปด้วยเครื่องแปรรูปอาหารโดยใช้ความดันสูงยิ่ง (หัวข้อ 3.4) ส่วนที่สองนำมาผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงบรรจุในถุงร้อนแบบหนา ขนาด 3x15 cm^2 ปริมาตรถุงละ 50 ml โดยทำการรีดไล่อากาศในถุงออก แล้วปิดผนึกด้วยความร้อนเช่นกัน

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมน้ำใบบัวบกพร้อมดื่มโดยใช้ความดันสูงยิ่ง

นำน้ำใบบัวบกที่บรรจุในถุงจากข้อ 3.3 มาผ่านเครื่องแปรรูปอาหารด้วยความดันสูงยิ่ง โดยทำการศึกษาถึงผลของระดับความดัน อุณหภูมิ และเวลา ต่อคุณภาพของน้ำใบบัวบกพร้อมดื่ม โดยผันแปรปัจจัย ดังนี้

ความดัน	3 ระดับ คือ	400, 500 และ 600 MPa
อุณหภูมิ	3 ระดับ คือ	30, 40 และ 50 °C
เวลา	2 ระดับ คือ	20 และ 40 นาที

ในการตรวจสอบขั้นต้น ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบคุณภาพด้านสี (หัวข้อ 3.5) pH (หัวข้อ 3.6) และจุลชีววิทยา (หัวข้อ 3.9) เท่านั้น เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมน้ำใบบัวบกพร้อมดื่มด้วยความดันสูงยิ่ง โดยอาศัยผลการตรวจเชื้อจุลินทรีย์เป็นเกณฑ์สำคัญ จากนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

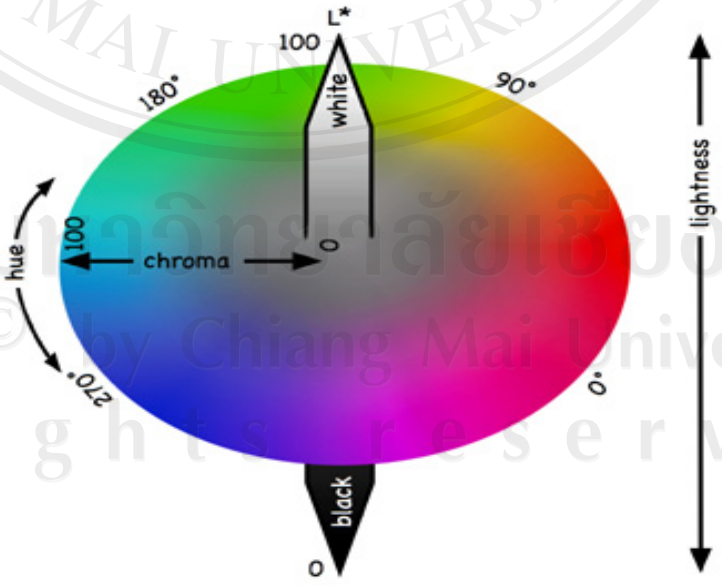
น้ำใบบัวบกพร้อมดื่มที่เตรียมโดยความดันสูงยิ่งจากสภาวะที่เหมาะสม จะนำมาศึกษาเพิ่มเติมโดยตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (หัวข้อ 3.7) และคลอโรฟิลล์ (หัวข้อ 3.8)

3.5 การตรวจสอบสี

ในการตรวจสอบสีของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ผู้วิจัยได้ใช้ค่าสีระบบ CIE L*C*H° โดยทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (calibration) ด้วยการตั้งค่าต่างๆ ดังนี้

Mode	เลือก	TTRAN (Total transmission) ใช้วัดสีวัตถุที่โปร่งใส
Scale	เลือก	CIELCh
Illuminant	เลือก	D 65
Procedure	เลือก	none
Observer	เลือก	10º
MI Illuminant	เลือก	Fcw

จากนั้นวัดค่าสีของตัวอย่าง โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:4 ใส่ตัวอย่างใน Quartz cell ขนาดความหนา 10 cm (ปริมาตร 20 ml) แล้ววัดค่าสีในระบบ ระบบ CIE L*C*H° โดยทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นากจากนี้ ทำการตรวจสอบความยาวคลื่นต่อเนื่องของค่า transmission ที่ความยาวคลื่น 400-700nm ร่วมด้วย



รูปที่ 3.1 วงล้อสีในระบบ CIE L*C*H°

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ; การแปลผลค่าสีที่วัดได้ เป็นดังนี้

L* (Lightness) เป็นค่าความสว่าง มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

L* มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง ตัวอย่างมีความสว่างน้อยจนเป็นสีคล้ำ

L*เข้าใกล้ 100 หมายถึง ตัวอย่างสว่างมากจนเป็นสีขาว

C* (Chroma) เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี

C* มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

C* มีค่าเพิ่มขึ้น หมายถึง วัตถุมีความเข้มสีเพิ่มมากขึ้น

H° (Hue) เป็นค่าแสดงถึงสีแท้จริงที่ปรากฏให้เห็น อยู่ในรูปองศาในวงกลม ซึ่งเริ่มต้นตั้งแต่ 0 องศา ถึง 360 องศา โดยสีในแกนหลักได้แก่

H° มีค่า 0 องศา แสดงสีแดง–ม่วง (ค่าสี a*+ ในระบบCIE L*a*b*)

H° มีค่า 90 องศา แสดงสีเหลือง (ค่าสี b*+ ในระบบ CIE L*a*b*)

H° มีค่า 180องศา แสดงสีเขียว (ค่าสี a*- ในระบบ CIE L*a*b*)

H° มีค่า 270 องศา แสดงสีน้ำเงิน (ค่าสี b*- ในระบบ CIE L*a*b*)

3.6 การวัดค่า pH

นำน้ำใบบัวบกตัวอย่าง 10 ml มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัด pH โดยก่อนวัดตัวอย่างจะทำการปรับมาตรฐานเครื่อง (calibration) ด้วย สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4.00 และ 7.00 ตามลำดับ แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่าง โดยใช้ pH probe จุ่มลงในตัวอย่างแช่ทิ้งไว้จนเครื่องขึ้นคำว่า ready อ่านค่าที่ได้และบันทึกผล

3.7 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

ในขั้นตอนนี้ ใช้วิธีการตรวจสอบของ Tsai *et al*. (2005) ซึ่งมีหลักการ คือ ตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย phenolic hydroxyl groups ของ total polyphenols เกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 765 nm ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดหาโดย เทียบกับปริมาณของกรดแกลลิค (gallic acid) มีวิธีการ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.7.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลิคที่ระดับความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm ปิเปตความเข้มข้นละ 2 ml ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol 5 ml ทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate 2 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จะได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลิค (ภาคผนวก ค)

3.7.2 การหาปริมาณสารฟีนอลิคในน้ำใบบัวบก

นำน้ำใบบัวบกตัวอย่าง 5 ml มาปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยง ที่ 12000 x g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสมา 2 ml เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol 5 ml ทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย sodium carbonate 2 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer แล้วนำค่าที่ได้มาแปลผลในรูปของปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลิค (หัวข้อ 3.7.1)

3.8 การหาปริมาณคลอโรฟิลล์

โดยทั่วไปคลอโรฟิลล์ ที่พบในพืชมี 2 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll a) และคลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll b) สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ และแอลกอฮอล์ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 nm และสำหรับวิธีการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ ผู้วิจัยได้ใช้วิธีการตรวจสอบของ Mahanom *et al.* (1999) ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

นำน้ำใบบัวบกตัวอย่าง 5 ml มาปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยง ที่ 12000 x g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปิเปตส่วนใสมา 2 ml เติม $CaCO_3$ 0.1 g และ 10 ml 80% Acetone เขย่ากรองแยกเอาส่วนใส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ต่อกรัมตัวอย่าง ดังสูตร

$$\text{Chl a (ml/ml leaf)} = \frac{((12.7 \text{x} \text{Abs}_{663}) - (2.6 \text{x} \text{Abs}_{645})) \text{x ml Acetone}}{\text{ml leaf tissue}}$$

$$\text{Chl b (ml/ml leaf)} = \frac{((22.9 \text{x} \text{Abs}_{645} - (4.68 \text{x} \text{Abs}_{663})) \text{x ml Acetone}}{\text{ml leaf tissue}}$$

$$\text{Total Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.9 การตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา

3.9.1 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (AOAC, 2000)

เตรียมตัวอย่างน้ำใบบัวบกแบบปลอดเชื้อ ทำเจือจางในสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 มล. จนได้ระดับ ความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-1}-10^{-10}) ใช้เทคนิค pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30-37°C นาน 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณ cfu/g (ml) ของอาหารได้จากสูตรนี้

$$\text{cfu/g or ml} = \frac{\sum C}{(V1n1 + 0.1n2)d}$$

เมื่อ v1 = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ΣC = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

n1 = จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก

n2 = จำนวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่ 2

d = ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับเชื้อได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

3.9.2 ปริมาณเชื้อยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2000)

เตรียมตัวอย่างน้ำใบบัวบกแบบปลอดเชื้อ ทำเจือจางในสารละลาย 0.1% peptone water หลอดละ 9 ml จนได้ระดับ ความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-1}-10^{-10}) ใช้เทคนิค pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดทาร์ทาริกแล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30°C นาน 2-3 วัน นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณ cfu/g (ml) ของอาหารเช่นเดียวกับสูตรหัวข้อ 3.9.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.10 การศึกษาผลของอายุการเก็บรักษาน้ำใบบัวบกพร้อมดื่มที่ผ่านการแปรรูปด้วยความร้อนและความดันสูงยิ่ง

ศึกษาผลของอายุการเก็บรักษา น้ำใบบัวบกพร้อมดื่มที่แปรรูปด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 วินาที (หัวข้อ 3.3) และน้ำใบบัวบกพร้อมดื่มที่แปรรูปด้วยความดันสูงยิ่ง ที่มีสภาวะเหมาะสมที่สุดจากการวิเคราะห์คุณภาพเบื้องต้น (หัวข้อ 3.4) แล้วนำน้ำใบบัวบกพร้อมดื่มที่เตรียมได้ทั้งสองกระบวนการดังกล่าว มาเก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยทำการสุ่มตัวอย่างทุกสัปดาห์ วิเคราะห์คุณภาพด้านสี (หัวข้อ 3.5) pH (หัวข้อ 3.6) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (หัวข้อ 3.7) คลอโรฟิลล์ (หัวข้อ 3.8) และจุลชีววิทยา (หัวข้อ 3.9)

3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในแต่ละการทดลอง ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์น้ำใบบัวบกพร้อมดื่ม ที่สภาวะต่างๆ ตลอดจนการตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา เป็นจำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มานำเสนอในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นอกจากนี้ข้อมูลของแต่ละชุดการทดลองได้นำมาวิเคราะห์เพิ่มเติมทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 14.0 โดยทดสอบความแตกต่างของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved