บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

- สาลี่เอเชียพันธุ์ Pathanak อายุ 21 สัปดาห์ หลังจากดอกบาน จากสถานีเกษตรหลวงดอยอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 สารเคมี

- เอนไซม์เปกติเนส (pectinase from mould ; EC 3.2.1.15 , Fluka , Germany)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodiumhydroxide ; NaOH , J.T. Baker , USA)
- ฟีนอล์ฟธาลีน (phenolphthalene ; $C_{20}H_{14}O_4$, Fluka , Germany)
- โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟธาเลท (potassium hydrogen phthalate ; $C_8H_5KO_4$, Fluka , Germany)
- กรดซิตริก (citric acid (food grade) ; S.K. Trading Co.ltd.)
- กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid (food grade) ; S.K. Trading Co.ltd.)
- โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (potassium metabisulfite ; $K_2S_2O_5$, S.K. Trading Co.ltd.)
- โปแตสเซียมซอร์เบท (potassium sorbate ; $C_6H_7KO_2$, Fluka , Germany)
- คอปเปอร์ซัลเฟท (copper sulfate pentahydrate ; $CuSO_4.5H_2O$, AnalaR , England)
- โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท (sodium potassium tartrate , $KNaC_4O_6.4H_2O$, Merck , Germany)
- เมธิลีนบลู (methyleneblue ; $(CH_2)_2NC_6H_3N{:}C_6H_3[N(CH_3)_2]{:}SCl.3H_2O$, J.T. Baker , USA)

- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ; H_2O_2 , Carlo Erba Reagenti , Germany)
- บรอโมฟีนอล์บลู (bromophenol blue ; $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, Fluka , Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid ; HCl , Merck , Germany)
- nutrient agar (Difco , USA)
- potato dextrose agar (Difco , USA)
- เปปโตน (peptone ; Difco , USA)
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ (ethanol ; C_2H_5OH , J.T. Baker , USA)
- เบนโตไนต์ (bentonite ; Sigma , USA)
- ซูโครส (sucrose ; food grade)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ

- เครื่องบด (Crusher , ผลิตภายในประเทศ)
- เครื่องอัดไฮดรอลิก (Hydraulic press , Carver Laboratory Press : Model M, USA)
- ตู้แช่แข็ง (Sunyo : Model SFC 65 A, Thailand)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance , Mettler-Toledo : Model AB 54, Switzerland)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance , Sartorious : Model B 3100 P, Germany)
- แผ่นให้ความร้อน (Stirring hot plate , Thermolyne ; Cimarec 2 : Model SP 46920-26, USA)
- เครื่องกรองสูญญากาศ (Vacuum suction , Medi - Pump : Model 1132B, USA)
- เครื่องอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Soda Stream : Model 301, England)
- เครื่องผนึกฝาจีบ (ผลิตภายในประเทศ)
- ขวดแก้วใสขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร (มูลนิธิโครงการหลวง)
- เครื่องวัดความดันก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Zahm and Nagel Co.ltd. USA)

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.1.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta Camera : Model CR 200, Japan)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV / Visible Spectrophotometer , Jasco : Model V 530, USA)

3.1.4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Microprocessor pH meters , Hanna Instruments : Model HI 9021, USA)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC , Shimadzu : Model CTO 6A, Japan)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand refractometer , Atago : Model N1 Brix 1~32%, Japan)
- ตู้อบอุณหภูมิสูง (Kottermann : Model 2711, Germany)

3.1.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave , Iwaki Glass Co.,Ltd. : Model ACV 3167, Japan)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator , Gallenkamp : B 6200, England)
- Larminar flow cabinet (Email Westinghouse Pty Ltd : Model 1687-0200/ 612-2, Australia)

3.1.4.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

- ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม ประกอบด้วย ถ้วยแก้วใส และแบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.1.5 เครื่องประมวลผลข้อมูลทางสถิติ

- เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป statistix version 3.5 และ 4.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป excel

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การเตรียมน้ำสาลี่

นำผลสาลี่มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ นาน 2.5 นาที หรือดูจนสีของเปลือกเปลี่ยนเป็นสีดำ นำมาแช่น้ำ ล้าง แล้วถูเอาเปลือกออก แช่ผลสาลี่ที่ปอกเปลือกแล้วในสารละลายโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ และกรดซิตริก ความเข้มข้นอย่างละ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ละผลจะถูกตัดแต่งเอาส่วนเสียและตำหนิออก หั่นเป็น 4 ชิ้น นำเข้าเครื่องบด (crusher) บดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ เติมสารละลายโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ และกรดแอสคอร์บิก ปริมาณ 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เติมเอนไซม์เปกติเนสปริมาณ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 90 นาที จึงคั้นด้วยเครื่องไฮดรอลิก (hydraulic press) ที่ระดับความดัน 5 เมตริกตันต่อตารางเมตร น้ำสาลี่ที่ได้จะถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอล์ออกซิเดส และเป็นการทำลายจุลินทรีย์บางส่วน ทำให้เย็นลง แบ่งใส่ถุง แล้วนำไปแช่แข็ง

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของเอนไซม์เปกติเนสที่มีต่อความหนืดและความขุ่นของน้ำสาลี่

การวิเคราะห์ความหนืด (viscosity) ของน้ำสาลี่

เติมเอนไซม์เปกติเนสความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำสาลี่ (ในการทดลองใช้น้ำสาลี่ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อขจัดสารแขวนลอยที่มีขนาดใหญ่ ควบคุมอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส โดยคนอย่างต่อเนื่อง วัดความหนืดด้วย Ostwald viscometer ค่าความหนืดที่วัดได้อยู่ในรูปของอัตราการไหล (เซนติเมตร/นาที) และตรวจสอบปริมาณเปกตินโดยวิธี

ทดสอบด้วยแอลกอฮอล์ (alcohol test) ตามวิธีของ Anonymous (1982) โดยนำน้ำสาลี่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ชนิด 95 เปอร์เซนต์ กับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ในอัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ใช้ปริมาตรของผสม 10 มิลลิลิตร ปิดจุก คว่ำหลอดขึ้นลง 3 - 5 ครั้ง ถ้ามีเปกตินที่ยังไม่ถูกย่อยสลายอยู่มาก จะเกิดเจลที่ด้านบนของของเหลวในหลอดทดลอง ตรวจสอบปริมาณเปกตินในแต่ละตัวอย่างทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง จนกระทั่งไม่พบเจลของเปกติน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การวิเคราะห์ความขุ่น (turbidity) ตามวิธีของ Wroldstad (1976)

นำตัวอย่างน้ำสาลี่ที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์เปกติเนสปริมาณ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทำให้มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2.5 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปกติเนส เตรียมสารละลายเบนโตไนต์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เติมสารแขวนลอยของเบนโตไนต์ปริมาณ 3,000 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในน้ำสาลี่ คนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที กรองน้ำสาลี่ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 วัดความขุ่นของน้ำสาลี่ที่กรองได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ค่าความขุ่นเป็นผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

การหาปริมาณกรดมาลิกและซิตริกโดยวิธี HPLC

ใช้สารละลายผสมมาตรฐานของกรดมาลิก (DL-malic acid) และกรดซิตริก (citric acid) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บันทึกความเข้มข้นและโครมาโตแกรมที่ได้ โดยดูจากค่า Retention time (RT) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (เอกชัย 2536)

ผลจากการวิเคราะห์ค่าทางกายภาพและทางเคมีของน้ำสาลี่ใส จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อให้ทราบความแตกต่างทางสถิติระหว่างค่าวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมีของน้ำสาลี่ใสที่ได้จากเครื่องบด และน้ำสาลี่ทางการค้าตรา IVY

ตอนที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของน้ำสาลี่และการยอมรับของผู้บริโภค

ตอนที่ 3.1 ศึกษาผลของค่า Brix/Acid ratio ที่มีต่อการยอมรับน้ำสาลี่ใส

นำน้ำสาลี่ใสมาปรับค่า Brix/Acid ratio โดยใช้ซูโครส ส่วนปริมาณกรดในน้ำสาลี่คิดเป็นกรดซิตริก (Jacobs , 1959) ให้มีอัตราส่วนของ Brix/Acid ratio เท่ากับ 22.37 (ควบคุม , control) , 28.53 , 34.94 และ 41.64 ซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 8 , 10 , 12 และ 14 บริกซ์ ตามลำดับ

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation)

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 8 - 10 คน ตัวอย่างจะถูกใส่ในถ้วยแก้วใส โดยใส่รหัสเป็นเลข 3 ตัว แบบสุ่มต่อหนึ่งตัวอย่าง ทำการทดสอบชิมที่อุณหภูมิห้อง ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของลักษณะต่าง ๆ (attributes) คือ สี (colour) ความขุ่น (turbidity) ความรู้สึกในปาก (mouth feel) กลิ่น (odour) ความหวาน (sweetness) ความเปรี้ยว (sourness) ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbonation level) และ การยอมรับโดยรวม (overall acceptance)

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะใช้แบบทดสอบ nine-point hedonic scale (ภาคผนวก ข) ซึ่งผู้ทดสอบสามารถแสดงความชอบและไม่ชอบต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ ออกมาเป็นระดับคะแนนตามที่กำหนด คือ 1 - 9 คะแนน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นทำการทดสอบชิมด้วยแบบทดสอบ ranking test ซึ่งผู้ทดสอบสามารถจัดเรียงลำดับความชอบที่มีต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 3.2 ศึกษาผลของค่า Brix/Acid ratio และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีต่อการยอมรับน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ

เป็นการทดลองพัฒนาสูตรของผลิตภัณฑ์น้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ เพื่อให้มีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งกำหนดปัจจัยในการศึกษา 2 ปัจจัย คือ ค่า Brix/Acid ratio และ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 + 2 c.p. Factorial Design กำหนดให้

ปัจจัย A คือ ค่า Brix/Acid ratio
ระดับต่ำ เท่ากับ 36
ระดับสูง เท่ากับ 56

ปัจจัย B คือ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ปริมาตร)
ระดับต่ำ เท่ากับ 0.0
ระดับสูง เท่ากับ 3.4

และสร้างสิ่งทดลอง ณ ระดับจุดกึ่งกลางของระดับต่ำและระดับสูงของปัจจัยทั้งสอง ดังแสดงในตารางที่ 3.2.1

การเตรียมตัวอย่างน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ

3.2.1. ขั้นตอนการเตรียมน้ำสาลี่ใส

- หลังจากปรับค่า Brix/Acid ratio ด้วยซูโครส ให้เติมโปแตสเซียม-ซอร์เบทปริมาณ 500 มิลลิกรัม/ลิตร
- พาสเจอร์ไรซ์น้ำสาลี่ใสที่อุณหภูมิ 85 - 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (Hsu และคณะ , 1990)
- นำตัวอย่างน้ำสาลี่แช่ในตู้เย็นให้มีอุณหภูมิระหว่าง 2 – 3 องศาเซลเซียส

3.2.2. ขั้นตอนการเตรียมภาชนะบรรจุ

- ล้างขวดแก้วใสขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ให้สะอาด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- แช่ฝาจีบสำหรับปิดผนึกขวดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์

3.2.3. ขั้นตอนการอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องอัดก๊าซ Soda Stream

- ล้างขวดที่ใช้สำหรับอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- เช็ดหัวพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ และเช็ดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

- บรรจุน้ำสาลี่ใสลงในขวดสำหรับอัดก๊าซปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- นำสลักที่ปากขวดเกี่ยวเข้ากับตัวเครื่องอัดก๊าซ Soda Stream
- กดที่ด้านบนของเครื่องเพื่ออัดก๊วซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในน้ำสาลี่ใส
- กรอกน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซลงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร อย่างรวดเร็ว แล้วปิดผนึกด้วยฝาจีบ

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation)

ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 8 - 15 คน ตัวอย่างน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซอุณหภูมิ 5 - 10 องศาเซลเซียส จะถูกใส่ในถ้วยแก้วใส โดยใส่รหัสเป็นเลข 3 ตัวแบบสุ่มต่อหนึ่งตัวอย่าง เทตัวอย่างใส่แก้วก่อนทดสอบชิมครั้งละ 3 ตัวอย่าง ทำการทดสอบชิมที่อุณหภูมิห้อง ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของลักษณะต่าง ๆ คือ สี ความขุ่น กลิ่น ความรู้สึกในปาก ความหวาน ความเปรี้ยว ระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ การยอมรับโดยรวม

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะใช้แบบทดสอบ nine-point hedonic scale ซึ่งผู้ทดสอบสามารถแสดงความชอบและไม่ชอบต่อลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ ออกมาเป็นระดับคะแนนตามที่กำหนด คือ 1 - 9 คะแนน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 3.2:1 รูปแบบแผนการทดลอง 2^2 + 2 c.p. Factorial Design

สูตรน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ	Brix/Acid ratio	ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ปริมาตร)
1 (1)	56	3.4
2 (a)	56	0.0
3 (b)	36	3.4
4 (ab)	36	0.0
5 (cp1)	46	1.7
6 (cp2)	46	1.7

ตอนที่ 4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำสาลี่ใสอัดก๊าซ

นำน้ำสาลี่ใสที่ปรับค่า Brix/Acid ratio ให้มีค่าเท่ากับ 56 และ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เท่ากับ 3.4 ปริมาตร บรรจุลงในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาตามวิธีของ Khurdiya และคณะ (1996) เป็นเวลา 14 สัปดาห์ ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยา ในสัปดาห์ที่ 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , 12 และ 14 ของระยะเวลาการเก็บรักษา

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ (Physical Analysis)

- ความขุ่น (turbidity) ตามวิธีของ Hsu (1990)
- สี (Hunter 's Color) ตามวิธีของ Minolta camera (1991)
- ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (volume of carbondioxide) ตามวิธีของ Zahm and Nagel Co., Ltd.

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี (Chemical Analysis)

- ปริมาณกรดทั้งหมด (total titratable acidity : % as malic acid) ตามวิธีของ AOAC (1990)
- ความเป็นกรด-ด่าง (final pH) ตามวิธีของ AOAC (1990)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar , before and after inversion : % w/v) ตามวิธีของ Lane and Eynon ใน AOAC (1990)
- ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide content) ตามวิธีของ AOAC (1990)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistical Analysis)

ผลจากการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลชีววิทยา จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม statistix version 3.5 และ 4.0 ด้วยวิธี analysis of variance , pairwise comparison of means และ linear regression เพื่อหาตัวแปรที่มีและไม่มีอิทธิพลต่อค่าวิเคราะห์ที่ได้ และเพื่อให้ทราบปริมาณของตัวแปรที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา (**Biological Analysis**) (อภิญญาและคณะ , 2536)

การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ โดยวิธี Pour Plate

- เจือจางตัวอย่างน้ำสาลี่ด้วยสารละลายเปปโตนที่มีความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ อยู่ในช่วงระหว่าง $10^{0} - 10^{-2}$
- ปิเปตตัวอย่างแต่ละระดับเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish) ที่ปลอดเชื้อ
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 48 - 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ เขย่าตัวอย่างอาหารและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากัน ทำระดับเจือจางละ 2 ครั้ง
- เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University