

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบ

- ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย (Lychee) จากสวนที่นำมาจำหน่ายที่สวนบวกหาด จังหวัดเชียงใหม่
- ดอกอัญชันช้อนสีน้ำเงิน (Butterfly pea) ที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดน้ำลิ้นจี่

- เครื่องปั่นผสม (Blender, Imarflex: Model IF-308, Thailand)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Hettich Zentrifugen Series Rotina 46 R, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath, Model D-30938, Germany)
- ตู้แช่แข็ง (Freezer, Sanyo: SF-C992NG, Italy)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสารสกัดจากดอกอัญชัน

- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator, Buchi: V800, Switzerland)
- เครื่องปั่น (Blender, Imarflex: IF-308, Thailand)
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Whatman, England)

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.1.4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter CR-300, Japan)

3.1.4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Microprocessor pH meters, Sartorius: PB10, Germany)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand refractometer, Atago: N-1E Brix 0-32%, Japan)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV / Visible spectrophotometer, PerkinElmer Series Lambda 35, UK)

3.1.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

- ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Micropipette, Wiggens hauser, Germany)
- เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex Geniez, Scientific Industries: Model G-560E)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: Model UM-500, Memmert, Germany)
- ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave oven, Sharp: R254, Thailand))
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator, Memmert, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Memmert, Germany)

3.1.4.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

- ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม
- แบบสอบถาม

3.1.5 สารเคมี

- โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite; $K_2S_2O_5$, Food grade, Lab P&P, Thailand)
- กรดมาลิก (Malic acid, Food grade, Lab P&P, Thailand)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, AR grade, Merck, Germany)
- กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid ; $(HOOC(CHOH)_2COOH$, Univar)
- เพลทเค๊าท์อะการ์ (Plate Count Agar, Scharlau, European Union)
- โปเตโต้เดกซ์โตรสอะการ์ (Potato Dextrose Agar, Scharlau, European Union)
- ลอรัลล์ ซัลเฟต บรอต (Lauryl sulphate broth, Scharlau, European Union)
- บิลแลน กรีน ไบล์ บรอต (Brilliant green lactose bile broth , Scharlau, European Union)
- เปปโตน (Peptone water (buffered), Merck, Germany)
- เอทานอล (Ethanol; C_2H_5OH , AR grade, Merck, Germany)
- น้ำกลั่น (Distillation water)

3.1.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์
- โปรแกรมประมวลผลทางสถิติสำเร็จรูป SPSS Version 10.0
- โปรแกรมประมวลผลทางสถิติสำเร็จรูป Design Expert Version 7.0

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ลื่นจี้ที่ใช้ทำน้ำลื่นจี้เสริมสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน คือ ผลลื่นจี้พันธุ์สองฮวย จากสวนที่นำมาจำหน่ายที่สวนบวกดาด นำผลลื่นจี้มาล้างทำความสะอาด และเอาแต่น้ำลื่นจี้ ร่อนได้น้ำลื่นจี้มากพอชั่งน้ำลื่นจี้ 1 กิโลกรัม ใส่ในโถปั่นของเครื่องปั่นไฟฟ้า เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.25 กรัม เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของน้ำลื่นจี้ ปั่นน้ำลื่นจี้ด้วยความเร็วระดับสูงสุดเป็นเวลา 3 นาที บรรจุลง HDPE ซ้อนสองชั้นเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา (รัตนา, 2546)

3.2.2 การวางแผนการทดลอง แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาคัดเลือกชนิดของเอนไซม์เพื่อใช้ในการสกัดน้ำลินจี่

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษา คือ เอนไซม์เพคตินเอส (pectinase) เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) และเอนไซม์เพคตินเอสร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส โดยใส่เอนไซม์รวมกันในอัตราส่วนของเอนไซม์เพคตินเอสกับเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 1:1 ในการศึกษาคัดเลือกชนิดของเอนไซม์วางแผนการทดลอง Central composite design แบบ linear (2x2 factorial experiment with 3 center points) โดยศึกษา 2 ปัจจัย โดยกำหนดค่าให้

ปัจจัย A คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์เพคตินเอส (ร้อยละ)

ระดับต่ำ	คือ ร้อยละ 0.10
จุดกึ่งกลาง	คือ ร้อยละ 0.20
ระดับสูง	คือ ร้อยละ 0.30

ปัจจัย B คือ เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)

ระดับต่ำ	คือ 1 ชั่วโมง
จุดกึ่งกลาง	คือ 2 ชั่วโมง
ระดับสูง	คือ 3 ชั่วโมง

ตาราง 3.1 แผนการทดลองความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการสกัด

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ร้อยละ)	เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)
1	0.10	1
2	0.10	3
3	0.30	1
4	0.30	3
5 (cp ₁)	0.20	2
6 (cp ₂)	0.20	2
7 (cp ₃)	0.20	2

ในการทดลองใช้เนื้อลีนจีตีป็น 50 กรัม เติมเอนไซม์ลงในแต่ละสิ่งทดลอง นำสิ่งทดลอง ไปสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (เมื่อเติมเอนไซม์เพคตินเอส) และสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เพคตินเอสร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส) จนครบตามเวลาที่กำหนด ขั้บยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกน้ำออกด้วยเครื่องแยกกาก (centrifugal machine) นำมาชั่งน้ำหนักห้ำรอยละของปริมาณผลผลิต (% yield) และวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ใช้วิธี Response surface methodology หาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด นำน้ำลีนจีที่ผลิตจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในสภาวะที่เหมาะสมมาเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาจากปริมาณผลผลิตและค่าใช้จ่ายของเอนไซม์

การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่าสี (colour) L*, a*, b*, C* และ H° ด้วยเครื่องวัดสี

การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

- วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid: °Brix) โดยใช้ hand refractometer (Brix 0-32) (AOAC, 2000)
- วัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity: % as malic acid) โดยใช้วิธีการไตเตรท (AOAC, 2000)
- วัดความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) (AOAC, 2000)

ตอนที่ 2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในการสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน วางแผนการทดลองแบบ Central composite design แบบ linear (2x2 factorial experiment with 3 center points) โดยศึกษา 2 ปัจจัย โดยกำหนดให้

ปัจจัย A คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

ระดับต่ำ	คือ ร้อยละ 65
จุดกึ่งกลาง	คือ ร้อยละ 80
ระดับสูง	คือ ร้อยละ 95

ปัจจัย B คือ เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)

ระดับต่ำ คือ 30 นาที

จุดกึ่งกลาง คือ 75 นาที

ระดับสูง คือ 120 นาที

ตาราง 3.2 แผนการทดลองอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด

สิ่งทดลอง	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)
1	65	30
2	65	120
3	95	30
4	95	120
5 (cp ₁)	80	75
6 (cp ₂)	80	75
7 (cp ₃)	80	75

ในการทดลองใช้ดอกอัญชันช้อนสีน้ำเงินที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ นำดอกอัญชันล้างด้วยน้ำสะอาด และนำเฉพาะกลีบดอกมาสกัดสารแอนโทไซยานิน โดยใช้กลีบดอกอัญชัน 25 กรัม บดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำสิ่งทดลองไปสกัดที่อุณหภูมิและเวลาจนครบตามกำหนด นำมากรองแบบสุญญากาศด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 1 นำมาตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี และหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธี Response surface methodology นำสารสกัดแอนโทไซยานินที่สกัดได้จากสภาวะที่เหมาะสมไปทำให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความดัน 72 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 20 นาที จึงนำไปเติมเป็นส่วนผสมในตอนที่ 3

การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่าสี (colour) L*, a*, b*, C* และ H° ด้วยเครื่องวัดสี

การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

- วัดปริมาณแอนโทไซยานิน (เกียรติกักดี, 2535)

ตอนที่ 3 การพัฒนาสูตรน้ำลิ้นจี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชันที่ผู้บริโภคพอใจที่สุด

การทดลองนี้เป็นการพัฒนาสูตรน้ำลิ้นจี่ ด้วยการเติมสารสกัดจากดอกอัญชันในปริมาณที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยวางแผนการทดลองแบบ Mixture design ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ใช้ในการหาส่วนผสมของสูตร โดยใช้หลักการที่ว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของส่วนประกอบใด ส่วนประกอบที่เหลือในสูตรจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงด้วย และผลรวมของส่วนประกอบ ทั้งหมดต้องเท่ากับ 1.0 หรือร้อยละ 100 (ไพโรจน์, 2536) ในการทดลองกำหนดระดับต่ำ (low level) และระดับสูง (high level) ของน้ำลิ้นจี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชัน โดยอัตราส่วนของน้ำลิ้นจี่ สารสกัดจากดอกอัญชัน และกรดมาลิก จะกำหนดให้อยู่ในช่วงระดับต่ำและระดับสูง ดังตาราง 3.3

ตาราง 3.3 อัตราส่วนของน้ำลิ้นจี่ สารสกัดจากดอกอัญชัน และกรดมาลิก

ส่วนผสม	ระดับต่ำ (ร้อยละ)	ระดับสูง (ร้อยละ)
น้ำลิ้นจี่	95	100
สารสกัดจากดอกอัญชัน	0	5
กรดมาลิก	0	0.05

เตรียมน้ำลิ้นจี่โดยนำเนื้อลิ้นจี่ตีปั่นมาเติมเอนไซม์ (ที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1) สกัดตามสภาวะจนครบกำหนด แยกน้ำออกด้วยเครื่องแยกกาก นำมากรองด้วยผ้าสักหลาด หลังจากนั้นนำน้ำลิ้นจี่ที่ได้มาผสมกับกรดมาลิก และสารสกัดจากดอกอัญชันตามสัดส่วนทั้ง 12 สิ่งทดลอง พาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว นำผลิตภัณฑ์น้ำลิ้นจี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชันทั้ง 12 สิ่งทดลอง มาวิเคราะห์สมบัติทางด้านกายภาพ ด้านเคมี และการทดสอบทางประสาทสัมผัส ผลของ Mixture design ที่ประกอบด้วยตัวแปร 3 ตัว เมื่อใช้โปรแกรม Design expert V.7.0 จะได้สิ่งทดลองดังแสดงในตาราง 3.4

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การทดสอบทางประสาทสัมผัสจะใช้ 9-points hedonic scale จำนวนผู้ทดสอบชิม 50 คน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดสอบชิมต้องทำให้เย็นจึงเทใส่ถ้วยมีรหัสเป็นตัวเลข 3 ตัว ซึ่งสุ่มจากตาราง สุ่มตัวอย่าง คุณลักษณะ (attributes) ที่ทำการทดสอบ ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ ความชอบรวม

ตาราง 3.4 สิ่งทดลองของ Mixture design ที่ประกอบด้วยตัวแปร 3 ตัวแปร

สิ่งทดลอง	น้ำล้นจี่ (ร้อยละ)	สารสกัดจากดอกอัญชัน (ร้อยละ)	กรดมาลิก (ร้อยละ)
1	95.00	5.00	0.00
2	97.49	2.49	0.02
3	100.00	0.00	0.00
4	96.24	3.72	0.04
5	97.50	2.50	0.00
6	95.00	4.95	0.05
7	99.95	0.00	0.05
8	98.72	1.24	0.04
9	95.00	4.98	0.02
10	99.95	0.00	0.05
11	100.00	0.00	0.00
12	98.75	1.24	0.01

การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่าสี (colour) L*, a*, b*, C* และ H° ด้วยเครื่องวัดสี

การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

- วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid: °Brix) โดยใช้ hand refractometer (Brix 0-32) (AOAC, 2000)
- วัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity: % as malic acid) โดยใช้วิธีการไตเตรท (AOAC, 2000)
- วัดความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) (AOAC, 2000)
- วัดปริมาณแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี pH differential (Wrolstad, 2000)

ตอนที่ 4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำล้นจี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชัน

ในการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์น้ำล้นจี่เสริมสารสกัดจากดอกอัญชันจะเปรียบเทียบน้ำล้นจี่ 2 ชนิด คือ ชนิดที่พาสเจอร์ไรซ์ก่อนบรรจุและชนิดพาสเจอร์ไรซ์หลังบรรจุ เตรียมน้ำล้นจี่

เสริมสารสกัดจากดอกอัญชันโดยนำเนื้อลื่นจีตีป่นมาเติมเอนไซม์ที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1 สกัดตามสภาวะที่เหมาะสมจนครบกำหนด แยกน้ำออกด้วยเครื่องแยกกาก และกรองด้วยผ้าสักหลาด หลังจากนั้นนำน้ำลื่นจีที่ได้มาผสมกับกรดมาลิก และสารสกัดจากดอกอัญชันตามสัดส่วนที่ได้จากตอนที่ 3 ซึ่งมีวิธีต้มฆ่าเชื้อก่อนบรรจุ คือ นำน้ำลื่นจีที่ผสมกับกรดมาลิกและสารสกัดจากดอกอัญชันตามสัดส่วน นำไปต้มฆ่าเชื้อจนกระทั่งวัดอุณหภูมิได้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (ดัดแปลงจากวิธีฆ่าเชื้อของ Somogyi และคณะ, 1996) บรรจุน้ำลื่นจีเสริมสารสกัดจากดอกอัญชันลงในขวดในขวดแก้ว ปิดฝาขวดทันที (ขวดแก้วและฝาขวดผ่านการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีก่อนบรรจุ) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว และวิธีต้มฆ่าเชื้อหลังบรรจุ คือ นำน้ำลื่นจีที่ผสมกับกรดมาลิกและสารสกัดจากดอกอัญชันตามสัดส่วน บรรจุลงในขวดแก้ว ปิดฝาขวดให้สนิท (ขวดแก้วและฝาขวดผ่านการต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาทีก่อนบรรจุ) นำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดจนวัดอุณหภูมิถึงกลางขวดได้ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว นำมาทดลองเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน ทำการสุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและทางเคมี ทุก 15 วัน สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ตรวจทุกเดือน

การวิเคราะห์ทางกายภาพ (Physical analysis)

- วัดค่าสี (colour) L*, a*, b*, C* และ H° ด้วยเครื่องวัดสี

การวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical analysis)

- วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid: °Brix) โดยใช้ hand refractometer (Brix 0-32) (AOAC, 2000)
- วัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity: % as malic acid) โดยใช้วิธีการไตเตรท (AOAC, 2000)
- วัดความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) (AOAC, 2000)
- วัดปริมาณแอนโทไซยานิน โดยใช้วิธี pH differential (Wrolstad, 2000)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Microbial analysis)

- วิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (Aerobic Plate Count) (AOAC, 2000)
- วิเคราะห์ยีสต์และรา (Yeasts and Molds) (AOAC, 2000)
- วิเคราะห์โคลิฟอร์มและอีโคไล (Coliform and *E.coli*) (AOAC, 2000)