บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

1. ผลหม่อนแก่ (สีแดงทั้งผล) ผลหม่อนห่าม (สีม่วงดำร้อยละ 50) และผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) พันธุ์เชียงใหม่ จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่
2. น้ำตาลทราย ตรามิตรผล

3.2 สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)
   - 1 % Phenolphthalein indicator (May & Baker, England)
   - 0.1 M Sodium hydroxide (Merck, Germany)
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Iland *et al*, 2000)
   - Copper sulphate (Merck, Germany)
   - Sodium potassium tartrate (Merck, Germany)
   - Sodium hydroxide (Merck, Germany)
   - Potassium iodide (Ajex, Australia)
   - Sulfuric acid (Merck, Germany)
   - Soluble starch (Food grade)
   - Sodium thiosulphate (Ajex, Australia)
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Waterman and Mole, 1994)
   - Gallic acid (Carlo, Italy)
   - Folin-ciocalteu reagent (Merck, Germany)
   - Sodium carbonate (Merck, Germany)
   - 95 % Ethanol (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Ranganna , 1986)

- 95 % Ethanol (Merck, Germany)
- 1.5 N Hydrochloric acid (Merck, Germany)

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์ซีทิน (Soong and Barlow, 2005)

- Methanol (Merck, Germany)
- 80% Acetonitrile (Merck, Germany)
- Quercetin (Merck, Germany)

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดัชนีสารแอนติออกซิแดนต์ (Patricia and Dan, 1978)

- Bata carotene (Sigma)
- Chloroform (Carlo Erba)
- Linoleic acid (BDH)
- Tween 40 (BDH)
- 95 % Ethanol (Merck, Germany)

7. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Yen and Hsieh, 1997)

- 95 % Ethanol (Merck, Germany)
- 2,2-diphenyl-1-pricrylhydrazyl (Sigma, USA)

8. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อยีสต์และรา และเชื้อโคลิฟอร์ม (BAM, 2001)

- Plate count agar (Merck, Germany)
- Potato dextrose agar (Merck, Germany)
- Lauryl sulfate tryptose broth (Merck, Germany)
- Brilliant green lactose bile broth (Merck, Germany)
- 0.1 % Peptone water (Merck, Germany)
- 10 % Tartaric acid (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. บรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัว (pouch) ขนาด 16.5x14 เซนติเมตร แบบถุงใส (ไม่ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) และแบบถุงทึบ (ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) (บริษัทรอแยลแคนประเทศไทย จำกัด)

2. เครื่องชั่งดิจิตอล (Tanita, KD-200, China)

3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus TS2KS, USA)

4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AND HR-200, Japan)

5. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ขนาด 0-32 องศาบริกซ์ (hand refractometer : ATAGO Model N-2E, Japan)

6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter : Cyber scan-510, Singapore)

7. เครื่องวัดสี (minolta chroma meter : CR-300, Japan)

8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer : Perkin Elmer-Lambda 12, Germany)

9. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC : Shimadzu LC-20A, Japan)

10. เตาให้ความร้อน (hot plate : Favorit, Malaysia)

11. ตู้อบลมร้อน (hot air oven : Memmert, Germany)

12. เครื่องปั่นอาหาร (blender : National MX-T31 GN, Taiwan)

13. เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (hot seal)

14. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

15. เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร (texture analyzer : TA.XT plus, UK)

16. เครื่องผสม (vortex mixture)

17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

18. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

19. ไมโครปิเปต (micropipette : Biohit PLC, Finland)

20. โถดูดความชื้น (desiccators) และกระป๋องอบความชื้น (moisture can)

21. ชุดเครื่องมือ และอุปกรณ์วิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

22. ชุดไตรเทรต

23. อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปิเปต กรวยแก้ว ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคน เหยือกน้ำ ถุงพลาสติก ยางรัด หม้อ ทัพพี ผ้าขาวบาง และตะแกรงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 วิธีการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ และเคมีของผลหม่อนพันธุ์เชียงใหม่ 3 ระยะความสุก คือ ผลแก่ (สีแดงทั้งผล) ผลห่าม (สีม่วงดำร้อยละ 50) และผลสุก (สีม่วงดำทั้งผล) จากนั้นนำไปทำผลิตภัณฑ์ผลหม่อนในน้ำเชื่อมในบรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัว หลังการเก็บรักษานำไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาวิจัย ดังนี้

3.4.1 ศึกษาลักษณะคุณภาพของผลหม่อน และน้ำหม่อนที่ระยะความสุกต่างกัน

นำผลหม่อนสุกพันธุ์เชียงใหม่ ที่ปลูกไว้ในแปลงของศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่ มาแบ่งระยะความสุกออกเป็น 3 ระยะ โดยการสังเกตผลหม่อนด้วยสายตา คือ ผลแก่ (สีแดงทั้งผล) ผลห่าม (สีม่วงดำร้อยละ 50) และผลสุก (สีม่วงดำทั้งผล) จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่าง ๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค ดังต่อไปนี้

- แรงตัดผลหม่อนให้ขาด โดยใช้เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร (texture analyzer)

- ปริมาณความชื้น (moisture content) โดยการอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compounds) ใช้สาร Folin-Ciocalteu reagent ทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่าง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโมเมตร เปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค (Waterman and Mole, 1994)

- ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (total anthocyanins) ทำการสกัดสารแอนโทไซยานินในตัวอย่างด้วย ethanolic HCl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ใช้สูตรในการคำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Ranganna, 1986)

- ปริมาณสารเคอร์ซีทิน (quercetin) โดยใช้เครื่อง HPLC (Soong and Barlow, 2005)

- ดัชนีสารแอนติออกซิแดนต์ (antioxidant index) โดยวัดอัตราการฟอกสีของสารเบต้าแคโรทีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (Patricia and Dan, 1978)

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำผลหม่อนสดทั้ง 3 ระยะความสุกข้างต้น ไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ บีบคั้นเอาเฉพาะของเหลวกรองผ่านผ้าขาวบาง นำของเหลวที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเอาสารละลายใสไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่าง ๆ ดังนี้

- ค่าสี (L* a* b*) โดยใช้เครื่องวัดสี minolta chroma meter

- ค่าความเข้มของสี (OD_{520}) โดยการนำสารละลายใสไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

- ค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)

- ปริมาณกรดทั้งหมด โดยนำสารละลายใสไปไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดซิตริก (AOAC, 2000)

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง hand refractometer (AOAC, 2000)

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Rebelein Method (Iland *et al*, 2000)

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

3.4.2 ศึกษาน้ำหนักบรรจุที่เหมาะสมของผลหม่อนในแต่ละระยะความสุก สำหรับการผลิตผลหม่อนในน้ำเชื่อม

นำผลหม่อนทั้ง 3 ระยะความสุกข้างต้น ล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัวแบบถุงใส (ไม่ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) ขนาด 16.5x14 เซนติเมตร ให้มีน้ำหนักบรรจุ (filled weight) ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 125 130 135 140 และ 145 กรัมต่อถุง แล้วเติมน้ำเชื่อมที่ได้จากการคำนวณ เพื่อให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของส่วนผสมเป็น 20$\pm$1.5 องศาบริกซ์ (อยู่ในช่วงของ heavy syrup; 18.0-21.9 องศาบริกซ์) จนมีน้ำหนักสุทธิ (net weight) เป็น 300 กรัมต่อถุง แล้วปิดผนึกด้วยแถบความร้อน นำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือด (อุณหภูมิ $\geq$ 95 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำหล่อเย็นจนอุณหภูมิเป็น 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 วัน หลังจากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด น้ำหนักทั้งหมด (total weight) น้ำหนักสุทธิ (net weight) น้ำหนักเนื้อ (drained weight) และน้ำหนักของเหลว (liquid weight) จากนั้นเลือกตัวอย่างที่มีน้ำหนักเนื้อมากกว่าร้อยละ 40 ของน้ำหนักสุทธิ ตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 179) พ.ศ.2540 เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ภาคผนวก ฉ) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 ศึกษาระยะความสุกของผลหม่อนที่เหมาะสม สำหรับการผลิตผลหม่อนในน้ำเชื่อม

นำผลหม่อนทั้ง 3 ระยะความสุกข้างต้น บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัวแบบถุงใส (ไม่ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) ขนาด 16.5x14 เซนติเมตร ตามน้ำหนักบรรจุที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.4.2 จากนั้นทำการผลิตเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 หลังการผลิต 15 วัน นำตัวอย่างในบรรจุภัณฑ์ไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ แล้วบีบคั้นเอาเฉพาะของเหลวกรองผ่านผ้าขาวบาง นำของเหลวที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที แล้วแยกเอาส่วนใสไปตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลทั้งหมด สารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารเคอร์ซีทิน ดัชนีสารแอนติออกซิแดนต์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ค่าสี ค่าความเข้มของสี ปริมาณกรดทั้งหมด ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ค วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบการยอมรับคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน ใช้แบบทดสอบ Hedonic Scale Test 9 Point (ภาคผนวก จ) ที่มีการกำหนดคะแนนการยอมรับจาก 1 คะแนน (ไม่ชอบมากที่สุด) ไปจนถึง 9 คะแนน (ชอบมากที่สุด) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เลือกระยะความสุกของผลหม่อนที่เหมาะสม สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.4.4 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ผลหม่อนในน้ำเชื่อม

นำผลหม่อนระยะความสุกที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 3.4.3 บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัวแบบถุงใส (ไม่ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) ขนาด 16.5x14 เซนติเมตร แล้วทำการผลิตเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 โดยอุณหภูมิเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 35$\pm$2 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 2 4 และ 6 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบ่มในตู้บ่มที่สภาวะอุณหภูมิ 36$\pm$1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน แล้วนำตัวอย่างที่ไม่มีการบวมของบรรจุภัณฑ์ไปตรวจผลยืนยันทางด้านจุลินทรีย์ โดยตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และเชื้อยีสต์และรา (yeast and molds) (BAM, 2001) จากนั้นเลือกระยะเวลาในการต้มฆ่าเชื้อที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นไปตามข้อกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมลิ้นจี่ในภาชนะบรรจุ (มอก. 67-2539) (ภาคผนวก ฉ) เพื่อใช้สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

3.4.5 ศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ผลหม่อนในน้ำเชื่อมระหว่างการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง

นำผลหม่อนระยะความสุกที่เหมาะสม บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ทนร้อนชนิดอ่อนตัว 2 รูปแบบ ได้แก่ แบบถุงใส (ไม่ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) และแบบถุงทึบ (ลามิเนตด้วยอลูมิเนียมฟอยล์) แล้วทำการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ผลหม่อนในน้ำเชื่อม ด้วยวิธีการที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพเหมือนข้อ 3.4.3 และตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อยีสต์และรา ทุก 3 เดือน วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.4.6 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากผลหม่อนในน้ำเชื่อม

นำผลิตภัณฑ์ผลหม่อนในน้ำเชื่อมที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องครบ 3 เดือน ไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส รวมถึงนำไปผลิตเป็นน้ำผลหม่อนพร้อมดื่ม เค้กผลหม่อน และไอศกรีมผลหม่อน แล้วทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่ผลิตจากผลหม่อนแช่เยือกแข็ง โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน ใช้แบบทดสอบ Hedonic Scale Test 9 Point (ภาคผนวก จ) ที่มีการกำหนดคะแนนการยอมรับจาก 1 คะแนน (ไม่ชอบมากที่สุด) ไปจนถึง 9 คะแนน (ชอบมากที่สุด) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved