

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis* Mill., ศูนย์การศึกษาหัวฮ่องไคร้ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่)
2. เมล็ดแมงลัก (*Ocimum basilicum* Linn., บริษัท ไร่ชัยญะ จำกัด จังหวัดนนทบุรี)
3. มะตูม (*Aegel marmelos*, บริษัท ส. กิจวัฒนา ฟู้ดส์ จำกัด กรุงเทพฯ)

3.1.2 สารเคมี

1. กรดมาลิก ($C_4H_6O_5$; Food grade, CM Chemical and Lab supplies, Thailand)
2. เอซีซัลเฟม-เค (Acesulfame potassium, Adinop Co., Ltd., Thailand)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต

1. ซองรีทอร์ทเพาซ์ (standing pouch) ขนาดบรรจุ 300 กรัม ความหนาของซองรีทอร์ทเพาซ์ 0.01 มม. ความกว้าง 14 ซม. และความสูง 16.5 ซม. (บริษัท รอยแลแคนอินดัสทรีส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร)
2. เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Vacuum Packing Machine Model GK-100, Super Vac, Austria)
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Multi-Process Laboratory Sterilizer : AR-091, FMC, France)
4. หม้อนึ่งความดันสูง (Pressure Sterilizer Model No. 1941X, Wisconsin

Aluminum Foundry Co., Inc., USA)

5. ชุดอุปกรณ์วัดอุณหภูมิระหว่างฆ่าเชื้อ (E-Val Flex, Ellab, Denmark)
6. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance, BP 3202S and BP210S, Sartorius, Germany)

7. ฟ้าขาวบาง

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องวัดสี (Hunter Lab Colorquest II Colour, USA)
2. เครื่องวัดความหนืด (Cannon ® Rotary Viscometers V-2000 Series II, Japan)
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand Refractometer, Atago : Model N1 Brix 0 - 32, Japan)
4. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH Meter, HANNA Instruments pH 211 Microprocessor pH Meter, Portugal)
5. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (Blender, EBR 100, Electrolux, China)
6. ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม
7. แบบสอบถาม

3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)
2. โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 13.0 (SPSS Inc., USA)
3. โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert Version 6.0.2 (Stat-Ease Inc., USA)

3.3 วิธีการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินงานทั้งหมด 6 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาอัตราส่วนเมล็ดแมงลักต่อน้ำ และเวลาที่เหมาะสมในการแช่เมล็ดแมงลัก

การเตรียมเมล็ดแมงลัก ทำความสะอาดโดยเอาเมล็ดแมงลักมาเลือกเอาเศษผงและสิ่งสกปรกออก ขจัดฝุ่นละอองให้มากที่สุด แช่เมล็ดแมงลักในน้ำที่อุณหภูมิห้อง ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเมล็ดแมงลักต่อน้ำเท่ากับ 1:50, 1:75 และ 1:100 คนให้เข้ากันปล่อยให้เมล็ดแมงลักดูดน้ำเป็นเวลาต่างๆ กัน นำเมล็ดแมงลักมาสะเด็ดน้ำด้วยกระชอน และชั่งน้ำหนักเมล็ดแมงลัก เพื่อหาเวลาที่เมล็ดแมงลักดูดน้ำจนพองตัวเต็มที่ ทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design)

ตอนที่ 2 การพัฒนาสูตรว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

การทดลองนี้เป็นการพัฒนาสูตรว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม โดยวางแผนการทดลองแบบ Mixture design เพื่อหาสูตรที่ดีที่สุดของว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม ในการทดลองกำหนดระดับต่ำ (low level) และระดับสูง (high level) ของปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย คือ ปริมาณน้ำมะตูม เมล็ดแมงลัก ว่านหางจระเข้ และเอซีซัลเฟม-เค ดังแสดงในตาราง 3.1 ได้สูตรทั้งหมด 18 สูตร โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-Expert Version 6.0.2 ดังแสดงในตาราง 3.2 เตรียมผลิตกัณฑ์ตามสูตรแล้วนำมาฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันสูงที่อุณหภูมิ 121^oC จนค่า F₀ เท่ากับ 5 นาที (Ghani และคณะ, 2001) นำผลิตกัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ทางกายภาพ วิเคราะห์ทางเคมี และทดสอบทางประสาทสัมผัส เพื่อคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุด

สูตรพื้นฐานว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

1. น้ำมะตูม	50 %
2. เมล็ดแมงลัก	29.5 %
3. ว่านหางจระเข้	20 %
4. เอซีซัลเฟม-เค	0.03 %

ตาราง 3.1 แสดงระดับสูง – ต่ำของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการหาสูตรที่ดีที่สุดของผลิตกัณฑ์ว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

ปัจจัย	ระดับต่ำ (ร้อยละ)	ระดับสูง (ร้อยละ)
น้ำมะตูม	50	70
เมล็ดแมงลัก	20	35
ว่านหางจระเข้	10	30
Acesulfame K	0.01	0.03

ตาราง 3.2 แผนการทดลองแบบ Mixture Design ในผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลัก
ในน้ำมะตูม ที่ประกอบไปด้วยตัวแปร 4 ตัวแปร

สิ่งทดลอง	น้ำมะตูม (ร้อยละ)	เมล็ดแมงลัก (ร้อยละ)	ว่านหางจระเข้ (ร้อยละ)	เอซีซัลเฟม-เค (ร้อยละ)
1	50.00	20.00	29.99	0.01
2	69.99	20.00	10.00	0.01
3	60.00	20.00	20.00	0.01
4	69.97	20.00	10.00	0.03
5	50.00	20.00	29.97	0.03
6	50.00	35.00	14.97	0.03
7	54.98	35.00	10.00	0.02
8	50.00	27.50	22.48	0.02
9	50.00	35.00	14.99	0.01
10	62.49	27.50	10.00	0.01
11	56.24	27.50	16.24	0.03
12	53.12	23.75	23.12	0.01
13	63.12	23.75	13.12	0.02
14	53.12	31.25	15.61	0.03
15	58.12	23.75	18.12	0.02
16	50.00	20.00	29.97	0.03
17	69.97	20.00	10.00	0.03
18	50.00	35.00	14.99	0.01

กระบวนการผลิต

1. เตรียมน้ำมะตูมโดย ล้างมะตูมแห้งน้ำหนักประมาณ 100 กรัม ให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง
อย่างมะตูมโดยใช้ไฟอ่อนๆ ประมาณ 30 วินาที เพื่อให้มะตูมหอม จากนั้นใส่มะตูมลงในน้ำเดือด
ปริมาตร 3 ลิตร ต้มประมาณ 20 - 30 นาที แล้วกรองเอามะตูมออกโดยใช้ผ้าขาวบาง วดความหนืด
เริ่มต้นของน้ำมะตูม

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

2. เตรียมเมล็ดแมงลัก โดยเอาเมล็ดแมงลักมาเลือกเอาเศษผงออก แช่เมล็ดแมงลักในน้ำ โดยใช้อัตราส่วนเมล็ดแมงลักต่อน้ำ ที่เหมาะสมตามอัตราส่วนที่ได้จากการทดลองในตอนที 1 คนให้เข้ากัน ปล่อยให้เมล็ดแมงลักพองตัวออกจนมีลักษณะเป็นเมือกขาวใส ตรงกลางเมล็ดแมงลักจะมีสีดำตามเวลาในการแช่ที่เหมาะสมที่ได้จากตอนที่ 1

3. เตรียมวุ้นทางจระเข้โดย เอาวุ้นทางจระเข้มาปอกเปลือก ล้างน้ำเอาอย่างสีเหลืองออกให้หมด ลวกในน้ำเดือดประมาณ 1 นาที จากนั้นนำมาหั่นเป็นลูกเต๋ายาวขนาดประมาณ $1 \times 1 \times 1$ cm

4. นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกัน เติมกรดมาลิกลงไปจน pH เท่ากับ 5.3

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- วัดค่าสี (colour) L^* , a^* , b^* โดยใช้เครื่องวัดสี Colorquest II Sphere Hunter Lab
- ความหนืดโดยใช้เครื่อง Cannon ® Rotary Viscometers V-2000 Series II

การวิเคราะห์ทางเคมี

- วัดของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid : °Brix) โดยใช้ Hand Refractometer (Brix 0-32) (AOAC, 2000)
- วัดความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter) (AOAC, 2000)

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

- การทดสอบทางประสาทสัมผัสจะใช้ 9-points hedonic scale จำนวนผู้ทดสอบชิมเป็นบุคคลทั่วไป 50 คน ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดสอบชิมต้องทำให้เย็นอุณหภูมิประมาณ $4-6^{\circ}\text{C}$ ก่อนแล้วจึงเทใส่ถ้วยที่มีรหัสเป็นตัวเลข 3 ตัว คุณลักษณะที่ทำการทดสอบ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

ตอนที่ 3 ศึกษาจุดที่ร้อนซ้ำที่สุดของผลิตภัณฑ์ในรีทอร์ทเพาซ์และการแทรกผ่านของความร้อนของผลิตภัณฑ์วุ้นทางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

การศึกษาจุดร้อนซ้ำที่สุด (cold point) ของผลิตภัณฑ์วุ้นทางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม นำผลิตภัณฑ์สุตรที่ดีที่สุดมาบรรจุในรีทอร์ทเพาซ์ที่มีขนาดบรรจุ 300 กรัม ความหนา 0.01 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีน้ำหนักสุทธิ (net weight) และน้ำหนักเนื้อ (drained weight) เท่ากับ 225 กรัม

และ 105.05 กรัม ตามลำดับ ปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกสุญญากาศ จากนั้นเสียบเทอร์โมคัปเปิลเข้าไปยังตำแหน่งต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ 3 ตำแหน่ง วัดจากขอบล่างของรีทอร์ทแพช คือ ระดับ 4.5 เซนติเมตร ระดับ 5 เซนติเมตร และระดับ 6.7 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ด้วยหม้อรีทอร์ทแบบพ่นน้ำโดยไม่มีการหมุนของตระกร้าระหว่างฆ่าเชื้อ ผลิตภัณฑ์มีอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 60°C ความหนืด และค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.46 ± 0.06 cps และ 5.52 ± 0.07 ตามลำดับ นำผลิตภัณฑ์ไปจัดเรียงในตระกร้าสเตนเลสโดยวางผลิตภัณฑ์ในแนวนอนจำนวน 9 ชั้น ชั้นละ 9 ถุง ในแต่ละชั้นจะมีแผ่นแยกชั้น (divider) วางคั่นระหว่างชั้นของรีทอร์ทแพชในตระกร้า ผลิตภัณฑ์ที่ถูกเสียบเทอร์โมคัปเปิลจะถูกวางไว้ในชั้นที่ 5 ของตระกร้า หรือ กึ่งกลางของตระกร้า ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดันไอน้ำ 1.5 บาร์) ความดันในรีทอร์ทเท่ากับ 2 บาร์ บันทึกอุณหภูมิขณะฆ่าเชื้อที่ตำแหน่งต่าง ๆ ด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิในขณะที่ฆ่าเชื้อ เพื่อหาจุดที่ร้อนช้าที่สุด ทำการทดลอง 2 ครั้ง ในแต่ละตำแหน่ง

ตอนที่ 4 ศึกษาเวลาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนของผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ และ เมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

นำผลิตภัณฑ์สูตรที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองตอนที่ 2 มาศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในหม้อรีทอร์ทแบบพ่นน้ำโดยไม่มีการหมุนของตระกร้าระหว่างฆ่าเชื้อ บรรจุผลิตภัณฑ์ในรีทอร์ทแพช ที่มีขนาดบรรจุ 300 กรัม ความหนา 0.01 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีน้ำหนักสุทธิ และน้ำหนักเนื้อ เท่ากับ 225 กรัม และ 105.05 กรัม ตามลำดับ ปิดผนึกถุงด้วยเครื่องปิดผนึกสุญญากาศ จากนั้นเสียบเทอร์โมคัปเปิลเข้าไปยังจุดร้อนช้าที่สุดที่ได้จากการทดลองตอนที่ 3 ผลิตภัณฑ์มีอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากับ 60°C ความหนืดเริ่มต้น เท่ากับ 0.46 ± 0.06 cP และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 5.52 ± 0.07 นำผลิตภัณฑ์ไปจัดเรียงในตระกร้าสเตนเลสโดยวางผลิตภัณฑ์ในแนวนอนจำนวน 9 ชั้น ชั้นละ 9 ถุง ในแต่ละชั้นจะมีแผ่นแยกชั้น (divider) วางคั่นระหว่างชั้นของรีทอร์ทแพชในตระกร้า ผลิตภัณฑ์ที่ถูกเสียบเทอร์โมคัปเปิลจะถูกวางไว้ในชั้นที่ 5 ของตระกร้า หรือ กึ่งกลางของตระกร้า ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดันไอน้ำ 1.5 บาร์) ความดันในรีทอร์ทเท่ากับ 2 บาร์ บันทึกอุณหภูมิขณะฆ่าเชื้อที่ตำแหน่งต่าง ๆ ด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิในขณะที่ฆ่าเชื้อ ข้อมูลที่บันทึกไว้จะถูกนำมาเขียนกราฟของ temperature deficit (ผลต่างระหว่างอุณหภูมิหม้อฆ่าเชื้อกับอุณหภูมิใจกลางผลิตภัณฑ์) บนกระดาษกราฟแบบ semi-log หาค่าต่างๆ จาก heating curve ดังนี้ lag factor สำหรับ heating (j_h) ความชันของ heating curve (f_h) ตัวแปร f_h/U และ Ball's process time ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง และวิเคราะห์

ค่าที่ได้ด้วยวิธีทางสถิติ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ทางกายภาพ วิเคราะห์ทางเคมี วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา และหาเวลาฆ่าเชื้อที่ให้ค่า F_0 เท่ากับ 5 นาที

ตอนที่ 5 ศึกษาผลของความเร็วรอบของการหมุน (rotation speed) และ ช่องว่างเหนือผลิตภัณฑ์ (headspace) ต่อเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ

นำผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูมในรีโตร์ทเพาซ์สูตรที่ดีที่สุด มาศึกษาผลของความเร็วรอบของการหมุนตะกร้าในหม้อรีโตร์ท (rotation speed) และ ช่องว่างเหนือผลิตภัณฑ์ (headspace) ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (ความดันไอน้ำ 1.5 บาร์) ความดันในรีโตร์ทเท่ากับ 2 บาร์ ฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์จนกระทั่งมีค่า F_0 เท่ากับ 5 นาที รักษาระดับความดันให้เท่ากัน ในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง โดยทำการทดลองที่ความเร็วรอบในการหมุนแตกต่างกัน คือที่ 2 rpm และ 6 rpm ดัดแปลงจากวิธีของ Ali และคณะ (2006) และช่องว่างเหนือผลิตภัณฑ์ 2 ระดับ โดยการควบคุมน้ำหนักสุทธิของอาหาร (net weight) ให้เท่ากับ 225 กรัม และ 180 กรัม โดยที่น้ำหนักสุทธิเท่ากับ 225 กรัม ผลิตภัณฑ์จะถูกบรรจุในรีโตร์ทเพาซ์ที่มีขนาดบรรจุ 300 กรัม ความหนา 0.01 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์จะมีน้ำหนักเนื้อ 105.05 กรัม และที่น้ำหนักสุทธิเท่ากับ 180 กรัม ผลิตภัณฑ์ถูกบรรจุในรีโตร์ทเพาซ์โดยมีน้ำหนักเนื้อเท่ากับ 84.04 กรัม บันทึกอุณหภูมิขณะฆ่าเชื้อที่ตำแหน่งต่าง ๆ ด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิในขณะที่ฆ่าเชื้อ ทำการทดลอง 2 ครั้ง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ทางกายภาพ วิเคราะห์ทางเคมี วางแผนการทดลองแบบ Factorial Design 2×2

ตอนที่ 6 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการแทรกผ่านความร้อนและสมบัติบางประการของผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูม

นำผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้และเมล็ดแมงลักในน้ำมะตูมสูตรที่ดีที่สุด ในรีโตร์ทเพาซ์ที่ได้จากตอนที่ 2 มาศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่ฆ่าเชื้อโดยแปรอุณหภูมิฆ่าเชื้อ 2 ระดับ คือ 121°C (ความดันไอน้ำ 1.5 บาร์) และที่ 116°C (ความดันไอน้ำ 1.2 บาร์) โดยกำหนดให้ความดันในรีโตร์ทเท่ากับ 2.0 บาร์ และ 1.5 บาร์ตามลำดับ ฆ่าเชื้อในหม้อฆ่าเชื้อที่ไม่มี การหมุนของตะกร้าขณะฆ่าเชื้อจนกระทั่งค่า F_0 เท่ากับ 5 นาที วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 2 ครั้ง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ทางกายภาพ วิเคราะห์ทางเคมี วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา และทดสอบทางประสาทสัมผัส