

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

1. แคปปา- คาร์ราจีแนน (GC 300 : บริษัท ไทยฟู้ดส์แอนด์เคมีคอล)
2. โลคัสต์บีนกัม (บริษัท ไทยฟู้ดส์แอนด์เคมีคอล)
3. มอลโทเดกซทริน (Maltrin M150 ค่า D.E. 15±2 : บริษัท เอส. ดับเบิ้ลยู. เกรทจำกัด)
4. น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (บริษัท น้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด)
5. ลำไยสดพันธุ์ตอ (ตลาดคอยติ อ.เมือง จ.ลำพูน)
6. กุ้งฟอยล์ (ไนลอนลามิเนตกับโพลีเอทิลีนเคลือบด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ขนาด 6x9), กุ้งไนลอน/โพลีเอทิลีน (ไนลอนลามิเนตกับโพลีเอทิลีนขนาด 6x9), กุ้งโพลีโพรพิลีนขนาด 6x9 (บริษัท ลีดเดอร์แพค)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับผลิตเยลลี่

1. เครื่องปั่นไฟฟ้า (Blender, EVE : miracle, China)
2. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer, Testo : 106-T1, England)
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Binder, Germany)
4. เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Vacuum Sealer, Audiovac : VM2010, USA)

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta : CR-310, Japan)
2. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer, TA-Xtplus, England)
3. เครื่องรีโอมิเตอร์ (Rheometer, TA Instruments : AR2000, USA)
4. เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี (Water Activity Meter, AquaLab : Model Series 3, Decagon Devices Inc., USA)
5. เครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum oven, Binder : VD 53, Germany)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Microprocessor pH meter WTW : pH537, Germany)
7. เครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet Apparatus)

8. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometer, ATAGO, Japan)
9. เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace, Gallenkamp: Model FSE520, England)
10. เครื่องย่อยตัวอย่าง (Digestor, Tecator, Sweden)
11. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (211 kjeltec Distillation Unit, Foss Tecator, Sweden)
12. เครื่องตีปั่น (Laboratory blender stomasher, Seward chemical : Model 400, England)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Gallenkamp, England)
14. เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex geniez, Scientific Industries : Model G560F)
15. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, Iwaki Glass CO,Ltd : Model AVC-3167, Japan)
16. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Hereaus : Model D-6450 Hanna, Germany)

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Merck, Germany)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric, Merck, Germany)
3. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, Merck, Germany)
4. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (Sodium potassium tartrate, Ajax, Australia)
5. กรดแอซีติก (Acetic acid, Merck, Germany)
6. ซิงค์แอซีเตตไดไฮเดรต (Zine acetate dihydrate, Ajax, Australia)
7. โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide, Ajax, Australia)
8. เมธิลีนบลู (Methylene blue, Fisher Science, UK)
9. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, Merck, Germany)
10. กรดบอริก (Boric acid, Merck, Germany)
11. เมทิลเรด (Methylred, May&Baker, USA)
12. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลต (Potassium hydrogen phthalate, Fluka, Germany)
13. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether, LAB-SCAN, Ireland)
14. กรดทาร์ทาริก (Tataric acid, Ajax, Australia)
15. Plate count agar (Merck, Germany)
16. Potato dextrose agar (Merck, Germany)
17. Peptone (Merck, Germany)

3.4 วิธีการทดลอง

การเตรียมเนื้อลำไย : ล้างลำไยด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง คั่วานเมล็ดออก และเปลือก ล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 1 ครั้ง และสะเด็ดน้ำออกจากเนื้อลำไย แบ่งใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 1 กิโลกรัม เก็บรักษาในตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการผลิตเป็นเซลล์

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ตอนคือ

ตอนที่ 1 การตรวจสอบคุณภาพเนื้อลำไย

สุ่มตัวอย่างเนื้อลำไยสด นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ข้อ ดังนี้
การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- วัดค่าสี L, C, H ในระบบ CIE LCH โดยเครื่องวัดสี Minolta Camera ; Chroma Meter

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณความชื้นโดยใช้ตู้อบแบบสุญญากาศ (moisture content) ตามวิธี AOAC (2000)
- ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (a_w) ด้วย Water Activity Meter
- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วย Hand refractometer
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Lane and Eynon ตามวิธี AOAC (2000)
- ปริมาณโปรตีน/ไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl method ตามวิธี AOAC (2000)
- ปริมาณไขมัน ตามวิธี AOAC (2000)
- ปริมาณเถ้า ตามวิธี AOAC (2000)
- ปริมาณเส้นใย ตามวิธี AOAC (2000)

ตอนที่ 2 หาสูตรที่เหมาะสมและศึกษาคุณภาพทางกายภาพและเคมีของเซลล์ลำไย

วางแผนการทดลองแบบส่วนผสม (mixture design) ประกอบด้วย 4 ปัจจัยคือเนื้อลำไย น้ำตาลผสม (น้ำตาลทราย : มอลโทเดกซทริน = 2 : 1) (สุวรรณ, 2543) แคลปเปอร์รายจีแน และ โกลด์สตาร์บีนกัม ซึ่งแผนการทดลองนี้มีหลักการว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของส่วนประกอบใด ส่วนประกอบที่เหลือในสูตรจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงด้วย และผลรวมของส่วนประกอบทั้งหมดต้องเท่ากับ 1.0 หรือร้อยละ 100 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการกำหนดสูตร การออกแบบแผนการทดลองนี้เรียกว่าการออกแบบแบบ extreme vertice

ตาราง 3.1 ค่าของระดับต่ำและระดับสูงของอัตราส่วนผสม

ส่วนผสม	ระดับต่ำ (ร้อยละ)	ระดับสูง (ร้อยละ)
เนื้อลำไย	60	80
น้ำตาลผสม	15	30
แคลป้า-คาร์ราจีแนน	0.25	1.0
โลคัสต์บีนกัม	0.25	1.0

ตาราง 3.2 สิ่งทดลองของ mixture design ที่ผันแปรอัตราส่วนผสม

สิ่งทดลองที่	เนื้อลำไย (ร้อยละ)	น้ำตาลผสม (ร้อยละ)	คาร์ราจีแนน (ร้อยละ)	โลคัสต์บีนกัม (ร้อยละ)
1	84.50	15.00	0.25	0.25
2	83.75	15.00	1.00	0.25
3	76.63	22.50	0.63	0.25
4	75.88	22.50	1.00	0.62
5	72.69	26.25	0.63	0.44
6	79.81	18.75	0.81	0.63
7	68.00	30.00	1.00	1.00
8	83.00	15.00	1.00	1.00
9	83.75	15.00	0.63	0.63
10	76.25	22.50	0.25	1.00
11	68.75	30.00	1.00	0.25
12	69.50	30.00	0.25	0.25

ขั้นตอนการผลิตเยลลี่ลำไย : ปั่นเนื้อลำไยด้วยเครื่องผสมอาหารความเร็วสูง 2 นาที ผสมน้ำตาลทราย มอลโทเดกซทริน คาร์ราจีแนน และ โลคัสต์บีนกัมเข้าด้วยกัน เพื่อป้องกันการจับตัวกันเป็นก้อน จากนั้นนำไปปั่นรวมอีกครั้งกับเนื้อลำไยที่ปั่นแล้ว ใช้เวลาปั่นประมาณ 1 นาที นำส่วนผสมที่ได้ไปต้มพร้อมคนตลอดเวลา จนส่วนผสมมีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เทลงพิมพ์ที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีจนเยลลี่แข็งตัว และเยลลี่ออกจากพิมพ์ ตัดให้ได้ขนาด 3 x3 x1.5 เซนติเมตร จัดวางเยลลี่ลงในถาดอุณหภูมิเย็น ให้มีระยะห่างระหว่างชิ้นเล็กน้อย นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบ 20 ชั่วโมง (จนเยลลี่ มีปริมาณความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 30 หรือ มีค่าวอเตอร์แอกติวิตีอยู่ในช่วง 0.75-0.80)

เมื่อได้เยลลี่ที่ผลิตตามสูตรที่กำหนดไว้แล้ว จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพเคมี และทางประสาทสัมผัส ดังนี้

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- วัดค่าสี L, C, H ในระบบ CIE LCH โดยเครื่องวัดสี Minolta Camera ; Chroma Meter
- ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Profile Analysis) โดยเครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyser) วัดค่า hardness adhesiveness cohesiveness springiness gumminess และ chewiness (Smewing, 1999)

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณความชื้นโดยใช้ตู้อบแบบสุญญากาศ (moisture content) ตามวิธี AOAC (2000)
- ค่าแอกทีวิตี (a_w) ด้วย Water Activity Meter
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Lane and Eynon ตามวิธี AOAC (2000)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) จากนั้นวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนผสมที่ใช้ทำเยลลี่ลำไยต่อคุณภาพด้านต่างๆ

การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำเยลลี่ที่ได้ไปทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ชิมที่เป็นผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 50 คน ทดสอบความชอบและการยอมรับโดยวิธีสเกล Hedonic (Hedonic scaling) 1-5 (1 = ไม่ชอบมากที่สุด 5 = ชอบมากที่สุด) ทดสอบคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ สี ความยืดหยุ่น กลิ่นลำไย รสหวาน ความเหนียว และความชอบรวม (ภาคผนวก ข) โดยแบ่งชิมช่วงเช้า 6 ตัวอย่างและช่วงบ่าย 6 ตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) จากนั้น นำข้อมูลที่ได้เข้าโปรแกรม Optimization เพื่อเลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุด

ตอนที่ 3 การหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมและศึกษาสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของ เยลลี่ลำไย

ทดสอบสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของเยลลี่ลำไยทั้ง 12 สิ่งทดลอง โดยใช้วิธีการทดสอบ 3 วิธี คือ การทดสอบการคืบ (creep test) การทดสอบการพักความเค้น (stress relaxation test) และการทดสอบแบบสั่น (oscillatory test) ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ชนิดควบคุมค่าความเค้น (controlled stress rheometer)

การเตรียมตัวอย่าง : นำเยลลี่ลำไยที่ผลิตได้ ตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ใบมีดเหมือนตัวอย่างให้ได้ความสูง 3 มิลลิเมตร ทารอบๆตัวอย่างด้วยซิลิโคนออยล์ (silicone oil) เล็กน้อยเพื่อป้องกันตัวอย่างแห้งในระหว่างวัด

1. หาค่าความเครียดหรือความเค้น ที่ไม่ทำให้โครงสร้างของตัวอย่างเสียหาย โดยวิธี stress sweep นำตัวอย่างเยลลี่ ที่มีลักษณะแข็งสุดและอ่อนสุดที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น ทำการทดสอบหาค่าความเครียด หรือความเค้นที่เหมาะสม เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ซึ่งได้แก่ ทดสอบการคืบ ทดสอบการพักความเค้น และทดสอบแบบสั่น

2. ทดสอบการคืบ นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ทดสอบการคืบโดยกำหนดค่าความเค้นคงที่ ใช้เวลาในการทดสอบ creep 5 นาที หลังจากนั้น ถอนแรงแล้วทดสอบ recovery อีก 15 นาที ทำการทดลอง 6 ซ้ำ พิจารณากราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า compliance (J) และเวลา จากนั้นทำการ fit curve เพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมพร้อมทั้งศึกษาสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของเยลลี่ลำไยโดยพิจารณาจากค่าตัวแปรทางวิสโคอิลาสติก เช่น ค่าอิลาสติกโมดูลัส (E_0) ค่าความหนืด (μ) การผิดรูปอย่างถาวร (J_{pd}) และเวลาหน่วง (retardation time : λ_{rel})

3. ทดสอบการพักความเค้น นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ทดสอบการพักความเค้นโดยกำหนดค่าความเครียดคงที่ ใช้เวลาในการทดสอบ 15 นาที ทำการทดลอง 6 ซ้ำ พิจารณากราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเค้นและเวลา จากนั้นทำการ fit curve เพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม พร้อมทั้งศึกษาสมบัติทางวิสโคอิลาสติกของเยลลี่ลำไยโดยพิจารณาจากค่าตัวแปรทางวิสโคอิลาสติก เช่น ค่าความเค้นสมดุลย์ (equilibrium stress) และเวลาการพักความเค้น (relaxation time : λ_{rel})

4. ทดสอบแบบสั่น นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ทดสอบ Frequency sweep โดยกำหนดค่าความเค้นคงที่ และกำหนดความถี่ในช่วง 0.01-10 Hz ทำการทดลอง 6 ซ้ำ พิจารณากราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง G' (storage modulus) G'' (loss modulus) เทียบกับค่าความถี่

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนผสมที่ใช้ทำเยลลี่ลำไยต่อตัวแปรทางวิสโคอิลาสติก

ตอนที่ 4 ศึกษาสถานะการเก็บรักษาและบรรจุภัณฑ์ต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของเยลลี่ลำไย

จากการ Optimization โดยโปรแกรม เมื่อได้เยลลี่สูตรที่มีความเหมาะสมแล้ว นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ในบรรจุภัณฑ์ 3 ชนิด คือ ถุงฟอยล์ บรรจุแบบสุญญากาศ ถุงไนลอน/โพลีเอธิลีน บรรจุแบบสุญญากาศ ถุงโพลีโพรพิลีน บรรจุแบบสภาวะบรรยากาศ โดยเยลลี่ลำไยที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน สุ่มมาวิเคราะห์ทุก 15 วัน สำหรับเยลลี่ลำไยที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน สุ่มมาวิเคราะห์ทุกวันที่ 3, 6, 9, 12, 15 และ 30

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- วัดค่าสี L, C, H ในระบบ CIE LCH โดยเครื่องวัดสี Minolta Camera ; Chroma Meter
- ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Profile Analysis) โดยเครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyser) วัดค่า hardness adhesiveness cohesiveness springiness gumminess และ chewiness (Smewing, 1999)

การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณความชื้นโดยใช้ตู้อบแบบสุญญากาศ (moisture content) ตามวิธี AOAC (2000)
- ค่าแอกทีวิตี (a_w) ด้วย Water Activity Meter
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Lane and Eynon ตามวิธี AOAC (2000)

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (AOAC, 1998)
- จำนวนยีสต์และรา (AOAC, 1998)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) เพื่อให้ทราบคุณภาพของเยลลี่ลำไยในระหว่างการเก็บรักษา