บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

1. ผลมะเกี๋ยง (สีม่วงดำทั้งผล) รวบรวมจากต้นมะเกี๋ยงที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิยาลัยเชียงใหม่ นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิจัย

2. ผลหม่อนสุก (สีม่วงดำทั้งผล) พันธุ์เชียงใหม่ รวบรวมจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่ นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการวิจัย

3.2 สารเคมี

1. เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด

- เอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast® 1.5L) ; Food grade (Novozymes, Denmark) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเบรนน์แท็ก อินกรีเดียน (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) (ภาคผนวก ฌ)
- เอนไซม์เพคติเนส (Pextinex® Ultra SP-L) ; Food grade (Novozymes, Denmark) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เบรนน์แท็ก อินกรีเดียน (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) (ภาคผนวก ฌ)

2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

- Acetic acid (RCI Lanscan, Thailand)
- Acetronitrile (Merck, Germany)
- Chloroform (Carlo, Italy)
- Deionised water (RCI Lanscan, Thailand)
- Ethanol (Merck, Germany)
- Ferric chloride anhydrous (Merck, Germany)
- Ferrous sulphate (Merck, Germany)
- Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)
- Formic acid (Merck, Germany)
- Gallic acid (Carlo, Italy)
- Gelatine (Gelita, New zealand)
- Hydrochloric acid (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Indigo carmine (Loba, India)
- Kaolin (Loba, India)
- Methanol (Merck, Germany)
- Phenolphthalein (May & Baker, England)
- Potassium chloride (Merck, Germany)
- Potassium hydrogen phthalate (Merck, Germany)
- Potassium permanganate (Merck, Germany)
- Potassium persulfate (Loba, India)
- Sodium acetate trihytrate (RCI Lanscan, Thailand)
- Sodium carbonate (Merck, Germany)
- Sodium chloride (RCI Lanscan, Thailand)
- Sodium hydroxide (food grad) (Sigma, USA)
- Soluble starch (Fisher Scientific, UK)
- Sulfuric acid (Merck, Germany)
- 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH (Sigma, USA)
- 2,2- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS (Fluka, Germany)
- 4,6- tripryridyl-5-triazine, TPTZ (Fluka, Germany)
- 6- hydroxy-2,5,7,8-tetramethychroman-2-carboxylic acid, Trolox (Aldrich, USA)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อยีสต์และรา

- Plate count agar (Merck, Germany)
- Potato dextrose agar (Merck, Germany)
- Peptone water (Merck, Germany)
- Tartaric acid (Merck, Germany)

3.3 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องปั่นผลไม้ (Sharp: Model EM-11, Japan)
- เครื่องคั้นน้ำแบบไฮดรอลิก (Sakaya : Model M310RZ, Thailand) (รูปผนวกที่ ก.3)
- เครื่องระเหยไอน้ำในสุญญากาศ (Marchcool Ltd., Thailand) (รูปผนวกที่ ก.4)
- ถุงผ้าสำหรับอัดไฮดรอลิก (Sakaya, Thailand) รูขนาดหยาบ
- เครื่องชั่งดิจิตอล (Tanita: Model KD-200, China)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus: Model TS2KS, USA)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AND: Model HR-200, Japan)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ขนาด 0-32 และ 28-62 °Brix (ATAGO: Model N-2E, Japan)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด- ด่าง (Cyber: Model scan-510, Singapore)
- เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter : Model CR-300, Japan)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Perkin Elmer : Model Lambda 12, Germany)
- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu: Model LC-20A, Japan)
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield-Programmable Viscometer: Model LVDV-II+, Germany)
- เตาให้ความร้อน (Favorit: Model 65A-68A, Malaysia)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Model Z 200 A , Germany)
- เครื่องผสม (Model Genie 2, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert: Model WB14, Germany)
- ไมโครปิเปต (Biohit PLC, Finland)
- เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
- โถดูดความชื้น (desicators) และกระป๋องอบความชื้น (moisture can)
- ชุดเครื่องมือ และอุปกรณ์วิเคราะห์จุลินทรีย์
- ชุดเครื่องมือไทเทรต
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปิเปต กรวยแก้ว ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคน ถังพลาสติก กะละมัง ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม

3.4 วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้ผลมะเกี๋ยงสด หรือผลมะเกี๋ยงแช่แข็งเป็นวัตถุดิบ นำไปศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสม โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนส เปรียบเทียบกับการบดแล้วคั้น และการต้มแล้วคั้น จากนั้นนำน้ำมะเกี๋ยงที่สกัดได้ไปทำให้เข้มข้น โดยใช้เทคนิคการทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สุญญากาศ ศึกษาการปรับปรุงสูตรที่เหมาะสมของน้ำมะเกี๋ยงโดยผสมกับน้ำหม่อนสกัดเข้มข้น รวมถึงการยอมรับทางประสาทสัมผัส และหาระยะเวลาการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งมีขั้นตอนการศึกษาวิจัย ดังนี้

1. การเปรียบเทียบคุณภาพของการสกัดน้ำมะเกี๋ยง นำผลมะเกี๋ยงสุก (สีม่วงดำทั้งผล) ที่แช่เยือกแข็งไปละลายน้ำแข็งโดยวางไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำไปสกัดน้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำ 3 ซ้ำ โดยใช้วิธีการสกัด 5 วิธี คือ

วิธีที่ 1 การบดแล้วคั้น โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender)

วิธีที่ 2 การต้มแล้วคั้น ใช้อัตราส่วนระหว่างผลมะเกี๋ยงกับน้ำ 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที

วิธีที่ 3 การบดแล้วเติมเอนไซม์เพคติเนส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เพคติเนส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีที่ 4 การบดแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก น้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิธีที่ 5 การบดแล้วเติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ร่วมกับเอนไซม์เพคติเนส 2,000 ppm โดยนำผลมะเกี๋ยงไปบดพอแตกด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ (blender) ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยน้ำหนัก ปรับ pH 4 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่ในน้ำอุ่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เซลลูเลส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิลงมาที่ 37 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เพคติเนส 2,000 ppm ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หลังจากนั้นในแต่ละวิธี ทำการแยกเอาน้ำมะเกี๋ยงออกโดยการนำไปบีบอัดด้วยเครื่องคั้นแบบไฮดรอลิคและกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น (ดัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2551) แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ ดังนี้

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่

- ค่าสี โดยการนำน้ำคั้นผลมะเกี๋ยงไปวัดค่าของสีด้วยระบบ L C h* ด้วยเครื่องวิเคราะห์ค่าสี Color Quest II Colorimeter (รุ่น CR 300 Series, Japan) (ดัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2551)

- ความเข้มของสี โดยการนำน้ำคั้นผลมะเกี๋ยงไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (OD_{520}) (ดัดแปลงจาก Iland *et al*., 2000)

- ค่าความหนืด โดยการนำน้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดความข้นหนืด Brookfield Viscometer (รุ่น LVDV-II, Germany) มีหน่วยเป็นเซนติพอยต์ (cps)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand Refractometer (N-10E, Atago Co., Ltd., Japan) (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยวัดด้วยเครื่อง pH meter (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซิตริก) โดยการไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic compound) ของน้ำมะเกี๋ยง (ดัดแปลงจาก Waterman and Mole, 1994)

- ปริมาณแทนนิน (AOAC, 2000 และ Atanassova and Christova Bagdassarian, 2009)

- ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanins) ของน้ำมะเกี๋ยง (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005)

- ปริมาณสารเคอร์ซีทิน (ดัดแปลงจาก Fecka and Turek, 2008) วัดเฉพาะวิธีที่ดีที่สุด

- ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Radicals scavenging) ของน้ำมะเกี๋ยงโดยใช้ 3 วิธี คือ Scanvenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH Method) (ดัดแปลงจาก Brand-Williams *et al.*, 1995 และ Šircelj *et al.,* 2010)

Scanvenging effect on 2,2- azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS Method) (ดัดแปลงจาก Re *et al*., 1999) และ

Ferric reducing Antioxidant Power (FRAP Method) (ดัดแปลงจาก Benzie and Strain, 1996)

จากข้อมูลคุณภาพที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test เลือกวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัดน้ำมะเกี๋ยงไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการระเหยน้ำมะเกี๋ยงสกัดโดยเทคนิคการระเหยภายใต้สุญญากาศ นำน้ำมะเกี๋ยงที่สกัดได้จากวิธีการที่เหมาะสมไประเหย โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporator) โดยแปรระดับอุณหภูมิของเครื่องระเหย 4 ระดับ คือ 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ที่ความดันคงที่ -0.94 บาร์ ความดันเกจ (Gauge pressure) ทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ระเหยน้ำจนน้ำมะเกี๋ยงสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 2 เท่า ทำซ้ำ 3 ครั้ง วัดอุณหภูมิสุดท้ายและบันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการระเหยน้ำมะเกี๋ยง วางแผนการทดลองแบบสุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตลอด (Completely Randomized Design, CRD) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีการในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่น และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (ดัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)

3. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการระเหยน้ำหม่อนสกัดโดยเทคนิคการระเหยภายใต้สุญญากาศ นำน้ำหม่อนสกัดที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส 1,500 ppm ที่อุณหภูมิ 37$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากสมชาย และคณะ, 2553) ไประเหย โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (vacuum evaporator) โดยแปรระดับอุณหภูมิของเครื่องระเหย 4 ระดับ คือ 60 65 70 และ 75 องศาเซลเซียส ที่ความดันคงที่ -0.94 บาร์ ความดันเกจ (Gauge pressure) ทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 10 นาที ระเหยน้ำจนน้ำหม่อนสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 4 เท่า ทำซ้ำ 3 ครั้ง วัดอุณหภูมิสุดท้ายและบันทึกเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการระเหยน้ำหม่อน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่น และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (ดัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)

4. การหาสูตรที่เหมาะสมของน้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นผสมน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่ม จากวิธีการทำน้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มที่เหมาะสมในขั้นตอนที่ 2 นำน้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มที่ได้ไปปรับปรุงคุณภาพ โดยทำการผสมกับน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่ม ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยวิธีการระเหยภายใต้สุญญากาศในขั้นตอนที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ Mixture Design กำหนดให้ในส่วนผสม คือ น้ำมะเกี๋ยงสกัดเข้มข้นร้อยละ 60 - 100 น้ำหม่อนสกัดเข้มข้นร้อยละ 5 - 30 และน้ำตาลร้อยละ 0-10 จากสูตรต่างๆ ที่แผนการทดลองกำหนดให้นำไปผลิตเป็นน้ำผลไม้ผสมเข้มข้น วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีในข้อ 2 นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนเป็นกราฟพื้นที่การตอบสนอง และคำนวณหาสูตรหรือสัดส่วนที่เหมาะสมที่ผู้ทดสอบชิมยอมรับ โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คนด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling Test (ไพโรจน์, 2535ก) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะต่างๆ (ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และรส) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DNMRT) (ไพโรจน์, 2535ก)

5. ศึกษาระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม นำน้ำมะเกี๋ยงผสมน้ำหม่อนสกัดเข้มข้นพร้อมดื่มในสูตรเหมาะสมจากข้อ 4 บรรจุในขวดแก้วขนาด 45 มิลลิลิตร และปิดฝาให้สนิท นำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดที่เวลาแตกต่างกัน 3 ช่วง คือ 2 4 และ 6 นาที วางแผนการทดลองโดยวิธีสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) สุ่มตัวอย่างหลังการผลิตทำทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีตามวิธีการในข้อ 2 และตรวจวิเคราะห์เพิ่ม ได้แก่ การตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count) ยีสต์และรา (yeast and molds) และจุลินทรีย์ก่อโรค ดัดแปลงจากวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (2001) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan New Multiple Range Test เลือกเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อ รวมทั้งศึกษาการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 50 คน ด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scaling Test (ไพโรจน์, 2535ก) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะต่างๆ (ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และรส) นอกจากนี้ยังมีการคำนวณต้นทุนการผลิต โดยคำนวณจากต้นทุนวัตถุดิบหลัก ส่วนผสมอื่นๆ และค่าพลังงานไฟฟ้า แล้วบวกเพิ่มอีกร้อยละ 30 เพื่อเป็นค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และค่าการจัดการ (ดัดแปลงจาก สมชาย และคณะ, 2553)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved