

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

1. นมสดขาดมันเนย ตรา เมจิ (บริษัท ซีพี-เมจิ จำกัด, ประเทศไทย)
2. เนยสดชนิดจืด ตรา กล้วยไม้ (บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด, ประเทศไทย)
3. นมผงตราแอนลิน (บริษัทฟอนเทียร่า แบนด์(ประเทศไทย) จำกัด, ประเทศไทย)
4. น้ำตาลเบเกอรี่ ตรา มิตรผล (บริษัท น้ำตาลมิตรผลจำกัด, ประเทศไทย)
5. กลิ่นวนิลา ตรา วินเนอร์ (ห้างหุ้นส่วนจำกัด เกรทฮิลล์, ประเทศไทย)
6. แป้งข้าวโพด ตรา คนอร์ (บริษัท ยูนิลีเวอร์ ไทย เทรคดิ้ง จำกัด, ประเทศไทย)
7. เคมีคีม (Kem keam) (ร้าน หยก จังหวัดเชียงใหม่, ประเทศไทย)
8. อินูลิน (inulin) (บริษัท ดีพีโอ(ประเทศไทย) จำกัด, ประเทศไทย)

3.2 เชื้อโพรไบโอติก

1. *Lactobacillus acidophilus* (บริษัท CHR-Hansen (Denmark), จัดจำหน่ายโดยบริษัท Brenntag ingredients (ประเทศไทย)) (ภาคผนวก ข)
2. *Lactobacillus casei* -01 (บริษัท CHR-Hansen (Denmark), จัดจำหน่ายโดยบริษัท Brenntag ingredients (ประเทศไทย)) (ภาคผนวก ข)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเชื้อ โพรไบโอติก

1. Flask 250 ml
2. ตะเกียงเบนเสน
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance , DENSER instrument : Model TB-403, Germany )
4. หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)

5. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)

6. เครื่องปั่นเหวี่ยง

### 3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิตไอศกรีม

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance , DENSER instrument : Model TB-403, Germany)

2. เครื่องปั่นผสมอาหาร (Paloma , Model BL-223)

3. เครื่องปั่นไอศกรีม (ยี่ห้อ Simac, gelataio magnum plus: GC 4000 E, Italy)

4. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer; OAKTON, Japan)

5. ตู้เย็น (ยี่ห้อ Whirlpool: Model WCF-95L, Japan )

6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 30 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ SANYO : Model SFC997(GYN), Japan)

7. ถ้วยพลาสติกสำหรับบรรจุไอศกรีม

8. เครื่องครัวต่าง ๆ

### 3.3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ

1. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer, Model LVDV-II+, USA)

2. เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter, Model CR 300 , Japan)

3. เครื่องวัดเนื้อสัมผัสไอศกรีม (Texture analyzer, Model TA.XT plus, England)

4. บีกเกอร์ (beaker)

5. ตะแกรงลวดขนาด 272 ช่องต่อตารางนิ้ว

6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Analytical balance, DENSER instrument: Model TB-403, Germany)

### 3.3.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)

2. งานเลี้ยงเชื้อ

3. หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)

4. หลอดทดลองพร้อมฝา
5. ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
6. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)

### 3.3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

1. ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม ประกอบด้วย ถ้วยพลาสติกขาว, ช้อนเล็ก, ถาดโฟมและแบบประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัส (ภาคผนวก จ.)

### 3.4 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (บริษัทเชียงใหม่โพลสตาร์, เชียงใหม่, ประเทศไทย)
2. MRS broth (Criterion, USA)
3. Peptone (Merck, Germany)
4. NaCl (Merck, Germany)
5. Agar (Himedia Laboratories, India)

### 3.5 เครื่องประมวลผลทางสถิติ

1. โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0

### 3.6 วิธีการทดลอง

ในการวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็นตอนต่าง ๆ ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของกระบวนการผลิตที่มีต่อการเหลือรอดเชื้อ *L. acidophilus*, *L. casei* และ สมบัติของไอศกรีม

#### 1.1 การเตรียมเชื้อโพรไบโอติก

การเตรียมเชื้อโพรไบโอติกทำได้โดยชั่งเชื้อโพรไบโอติก (*L. acidophilus* หรือ *L. casei*) ที่อยู่ในรูปผง (freeze dried powder) ปริมาณ 0.2 กรัม ใส่ใน MRS Broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่ 37° C

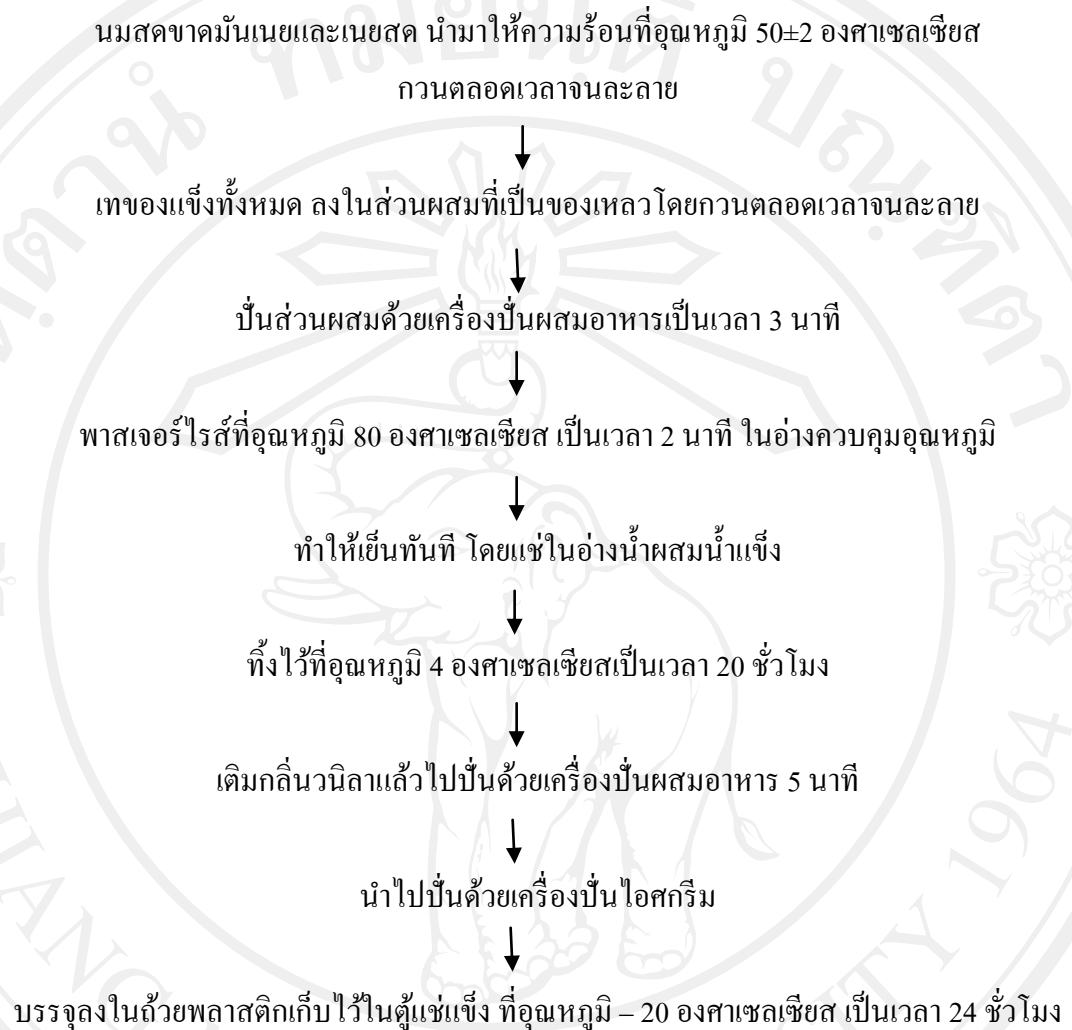
เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว ให้นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที (ภาคผนวก ข)

#### 1.2 การผลิตไอศกรีมสูตรควบคุม

ไอศกรีมนมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีส่วนผสมพื้นฐาน (ตารางที่ 3.1) และวิธีการผลิตไอศกรีมนม (รูปที่ 3.1) ที่ดัดแปลงจากการศึกษาของ อภิรักษ์ และ Wirjantoro (2552) กรรมวิธีการผลิตไอศกรีมวนิลา ทำได้โดยโดยผสมวัตถุดิบที่เป็นของแห้งได้แก่ นมผงขาดมันเนย, น้ำตาลซูโครส, สารให้ความคงตัว และแป้งข้าวโพด ให้เข้ากัน นำวัตถุดิบที่เป็นของเหลวได้แก่ นำนมขาดมันเนยและเนยสดชนิดจืด ตั้งไฟที่อุณหภูมิประมาณ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส เมื่อเนยสดชนิดจืดละลายหมด เติมวัตถุดิบที่เป็นของแห้งลงไปจนจนละลายดี จึงนำส่วนผสมไปปั่นในเครื่องปั่นผสมอาหารความเร็วสูงนาน 2 นาที เพื่อให้ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกันและเป็นการโฮโมจิไนส์ไอศกรีมเหลวที่ได้ แล้วพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ  $80 \pm 1$  องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที จึงลดอุณหภูมิการผสมอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไอศกรีมเหลวดังกล่าวมาบ่มที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไอศกรีมเหลวที่ผ่านการบ่มมาเติมกลิ่นวนิลา และปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร 2 นาที และนำไปปั่นในเครื่องปั่นไอศกรีมเป็นเวลา 45 นาที ควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส บรรจุไอศกรีมที่ได้ลงในถ้วยพลาสติกมีฝาปิด นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมพื้นฐานของไอศกรีม

| ส่วนผสม   | ปริมาณ (%) |
|---|------------|
| นมสดขาดมันเนย (ไขมัน 0 %)                           | 76         |
| นมผงขาดมันเนย (ไขมัน 0 % ปริมาณของแข็งทั้งหมด 97 %) | 4          |
| เนยสด   | 7          |
| น้ำตาลซูโครส  | 12         |
| เคมคิม  | 0.6        |
| แป้งข้าวโพด   | 0.2        |
| กลิ่นวนิลา  | 0.2        |



ภาพที่ 3.1 แผนผังกรรมวิธีการผลิตไอศกรีม(ดัดแปลงจาก Marshall และ Arbuckle, 1996)

### 1.3 การผลิตไอศกรีมสูตรเดิมเชื้อโพรไบโอติก

เตรียมไอศกรีมตามข้อ 1.2 โดยเติมเชื้อโพรไบโอติก (*L. acidophilus* หรือ *L. casei*) หลังขั้นตอนการทำให้เย็นโดยทันที (ภาพที่ 3.2)

นมสดขาดมันเนยและเนยสด นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ  $50 \pm 2$  องศาเซลเซียส

กวนตลอดเวลาจนละลาย

เทของแข็งทั้งหมด ลงในส่วนผสมที่เป็นของเหลวโดยกวนตลอดเวลาจนละลาย

ปั่นส่วนผสมด้วยเครื่องปั่นผสมอาหารเป็นเวลา 3 นาที

พาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ

ทำให้เย็นทันที โดยแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง

เติมเชื้อโพรไบโอติก

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

เติมกลิ่นวนิลาแล้วไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร 5 นาที

นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไอศกรีม

บรรจุลงในถ้วยพลาสติกเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.2 แผนผังกรรมวิธีการผลิตไอศกรีมสูตรเดิมเชื้อโพรไบโอติก (ดัดแปลงจาก Marshall และ Arbuckle, 1996)



1.4 วิเคราะห์สมบัติของส่วนผสมไอศกรีมและไอศกรีม ตัวอย่างของส่วนผสมไอศกรีม และไอศกรีมจะถูกนำมาวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ ดังนี้

1.4.2 สมบัติด้านจุลชีววิทยา ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโพรไบโอติกในระหว่างกระบวนการผลิตไอศกรีม ดังนี้ ปริมาณในส่วนผสมก่อนการบ่ม ปริมาณที่เหลือรอดหลังการบ่ม ปริมาณที่เหลือรอดหลังการปั่นไอศกรีม และปริมาณที่เหลือรอดหลังการทำให้งแข็ง โดยใช้เทคนิคการ pour plate กับตัวอย่างที่ความเจือจางระดับต่างๆ โดยใช้ MRS Agar แล้วนำไปบ่มที่ 37°C ใน Anaerobic Jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีที่ใช้ในรายงานของ พรหทัย และ บวรศักดิ์ (2550)

1.4.2 สมบัติด้านกายภาพของไอศกรีมเหลวและไอศกรีม

1. ความหนืด (ดัดแปลงวิธีของ Chang et al., 1995) วัดความหนืดของไอศกรีมเหลวหลังผ่านกระบวนการบ่มที่อุณหภูมิประมาณ  $4 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยเครื่องวัดความหนืด ใช้หัวหมุนเบอร์ 1 อ่านค่าที่ได้หลังมอเตอร์หมุน 30 วินาที ควบคุมอุณหภูมิเหลวที่  $20 \pm 1$  องศาเซลเซียส วัดสิ่งทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง

2. วัดโอเวอร์รัน (overrun) ของไอศกรีมหลังผ่านกระบวนการปั่นโดยกำหนดปริมาตรคงที่ (Arbuckle, 1986) ชั่งน้ำหนักไอศกรีมเหลวในถ้วยพลาสติกขนาดความจุ 30 ลูกบาศก์มิลลิลิตร บนเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักไอศกรีมเหลว หลังจากปั่นเป็นไอศกรีม ชั่งน้ำหนักไอศกรีมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกใบเดิม บันทึกค่าน้ำหนักไอศกรีมที่ได้ นำข้อมูลไปคำนวณค่าโอเวอร์รัน ดังสมการต่อไปนี้อัตราสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง

$$\text{โอเวอร์รัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักไอศกรีมเหลว} - \text{น้ำหนักไอศกรีม}) \times 100}{\text{น้ำหนักไอศกรีม}}$$

3. วัดอัตราการละลาย (ดัดแปลงวิธีของ Guinard et al., 1997; Roland et al., 1999) บรรจุไอศกรีมหลังผ่านกระบวนการปั่นลงในถ้วยพลาสติกให้ได้น้ำหนัก  $150 \pm 5$  กรัม นำไอศกรีมไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดอัตราการละลายที่อุณหภูมิห้อง  $25 \pm 1$  องศาเซลเซียส โดยวางไอศกรีมบนตะแกรงลวดเบอร์ 4 รองรับไอศกรีมที่ละลายด้วยบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เริ่มวัดอัตราการละลายเมื่อไอศกรีมมีอุณหภูมิ  $-10 \pm 0.1$  องศาเซลเซียสที่ระดับความลึก 1 เซนติเมตรจากผิวหน้าไอศกรีม โดยวัดจากแท่งวัดอุณหภูมิ (thermocouple) จากนั้นชั่งน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คำนวมน้ำหนักไอศกรีมที่ละลายคิดเทียบน้ำหนัก 100 กรัม ดังสมการข้างล่าง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟกับเวลา (นาที) เพื่อหาความชัน รางงานเป็นอัตราการละลายต่อ 100 กรัม วัดสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ง)

$$\text{น้ำหนักไอศกรีมที่ละลายต่อ 100 กรัม} = \frac{\text{น้ำหนักไอศกรีมที่ละลาย} \times 100}{\text{น้ำหนักไอศกรีมเริ่มต้น}}$$

4. วัดเนื้อสัมผัสไอศกรีม (ดัดแปลงวิธีของ Guinard et al., 1997) บรรจุไอศกรีมหลังผ่านกระบวนการปั่นเต็มถ้วยพลาสติกขนาด 30 ลูกบาศก์มิลลิลิตร นำไปผ่านการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดเนื้อสัมผัสของไอศกรีม จากค่าแรงกดสูงสุดด้วยระยะทางคงที่สถานะที่ใช้วัดได้แก่ ใช้หัววัดชนิด P2 โหลดเซลล์รับน้ำหนักได้ 50 กิโลกรัม ความเร็วในการเคลื่อนที่ของหัววัดก่อนทดสอบ ขณะทดสอบ หลังทดสอบอยู่ที่ 2.0, 1.0 และ 1.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ตามลำดับ วัดแรงเมื่อความลึกของหัววัดเป็น 15 มิลลิเมตร โดย วัดตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-10 \pm 0.1$  องศาเซลเซียสจากผิวหน้าของไอศกรีม ที่ระดับความลึก 1 เซนติเมตรจากผิวหน้าไอศกรีม โดยวัดจากแท่งวัดอุณหภูมิ วัดสิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัวอย่าง



5. วัดค่าสีตัวอย่างไอศกรีมหลังผ่านกระบวนการปั่น บรรจุลงในถ้วยพลาสติกขนาด 30 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นำไปผ่านการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเครื่องวัดสีระบบ ฮันเตอร์ (L\*, a\*, b\*) ด้วยเครื่องวัดสี

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลองด้านกายภาพของไอศกรีม การทดลองในตอนนี้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rank Test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 %

### ตอนที่ 2 การศึกษาผลของปริมาณของฟรุ๊ไบโอติก ต่อการเลือกรอดเชื้อโพรไบโอติกและสมบัติของไอศกรีมซินไบโอติก

การศึกษาในตอนนี้ทำการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่มีปริมาณเลือกรอดมากที่สุด ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากผลการทดลองตอนที่ 1 มาทำการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารฟรุ๊ไบโอติก โดยมีการเตรียมส่วนผสมไอศกรีมเช่นเดียวกับการศึกษาตอนที่ 1 แต่มีการเติมสารฟรุ๊ไบโอติก (อินูลิน) ซึ่งในส่วนผสมการผลิตไอศกรีมนั้นจะจัดอินูลินอยู่ในส่วนผสมที่เป็นของแข็ง คือ เติมอินูลินพร้อม นมผงขาดมันเนย, น้ำตาลซูโครส, สารให้ความคงตัว และแป้งข้าวโพด โดยผันแปรปริมาณความเข้มข้นของสารฟรุ๊ไบโอติก 3 ระดับ (2, 3 และ 4 %) นำส่วนผสมไอศกรีมที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลอง (treatment) ไปผลิตเป็นไอศกรีมตามข้อ 1.3 ตัวอย่างไอศกรีมที่ได้นำไปวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ เช่นเดียวกับการศึกษาตอนที่ 1

### ตอนที่ 3 การศึกษาผลของปริมาณของน้ำตาลต่อการเลือกรอดเชื้อโพรไบโอติกและสมบัติของไอศกรีมซินไบโอติก

การศึกษาในตอนนี้อาศัยผลการศึกษาในตอนที่ 2 มาทำการศึกษาผลของน้ำตาลต่อการเลือกรอดของเชื้อโพรไบโอติก และสมบัติของไอศกรีมซินไบโอติกที่ได้ ทำการเตรียมส่วนผสมไอศกรีมเช่นเดียวกับการศึกษาตอนที่ 2 แต่ทำการผันแปรปริมาณของน้ำตาลในส่วนผสม 3 ระดับ คือ 12, 15 และ 18% (w/w) นำส่วนผสมไอศกรีมที่ได้ไปผลิตเป็นไอศกรีมซินไบโอติกตามกรรมวิธี เช่นเดียวกับการศึกษาในตอนที่ 2

ตัวอย่างไอศกรีมที่ได้นำไปวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ เช่นเดียวกับการศึกษาตอนที่ 2 และเพิ่มการวิเคราะห์สมบัติด้านประสาทสัมผัสของไอศกรีมซินไบโอติกด้วยโดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD และทดสอบการให้คะแนนความชอบ โดยวิธี Hedonic scoring test 9 point ซึ่งมีระดับคะแนน 1-9 (1 = ไม่ชอบมากที่สุด ถึง 9 = ชอบมากที่สุด) เพื่อประเมินความชอบในลักษณะสำคัญต่างๆ ของไอศกรีมซินไบโอติก ใช้ผู้บริโภคนในการทดสอบจำนวน 50 คน ปัจจัยที่ใช้ทดสอบได้แก่ ความเรียบเนียน สี กลิ่นรสวนิลา ความมัน ความเหนียวหนืด การละลายในปาก และความชอบรวม