

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

1. มะขามหวานพันธุ์สีทอง อายุฝัก 150-180 วัน ฝักเป็นสีน้ำตาลเนื้อแยกจากฝัก มีความสุกเต็มที่
2. เอนไซม์เพคตินเนสทางการค้า Pectinex Ultra SP-L® ของบริษัท Novo Nordisk Ltd. ประเทศสวีเดน รายละเอียดภาคผนวก ก1.1
3. เอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า Celluclast 1.5 L® ของบริษัท Novo Nordisk Ltd. ประเทศสวีเดน รายละเอียดภาคผนวก ก1.2

สารเคมี

รายละเอียดของสารเคมี แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	รุ่น : บริษัท
1. กรดทาร์ทาริก	Food grade : MERKS
2. น้ำตาลทรายขาว	Food grade : มิตรผล
3. โซเดียมเบนโซเอต	Food grade : MERKS
4. folin ciocalteu phenol	Analyze grade : MERKS
5. กรดแทนนิก	Analyze grade : MERKS
6. EDTA	Analyze grade : MERKS
7. กรดอะซิติกเข้มข้น	Analyze grade : CARLO ERBA
8. กรดซัลฟูริกเข้มข้น	Analyze grade : MERKS
10. เอธิลแอลกอฮอล์ 99%	Analyze grade : MERKS
11. Carbozole	Analyze grade : MERKS
12. กรดกาแลคทูโรนิก	Analyze grade : SIGMA
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์	Analyze grade : CARLO ERBA
14. ไดโซเดียมซัลเฟต	Analyze grade : CARLO ERBA

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

สารเคมี	รุ่น : บริษัท
15. โปแตสเซียมโซเดียมทาร์ทาเตรด	Analyze grade : MERKS
16. คอปเปอร์ซัลเฟต 5. ไฮเดรต	Analyze grade : SIGMA
17. D- กลูโคส	Analyze grade : MERKS
18. ฟีนอล์ฟธาไลน์	Analyze grade : MERKS
19. โปตัสเซียมนอพธาเลต	Analyze grade : MERKS
20. เพคติน	Analyze grade : MERKS
21. คาร์บอกซิลเมทิลเซลลูโลส	Analyze grade : DIFCO
22. potato dextrose agar	

วัสดุอุปกรณ์

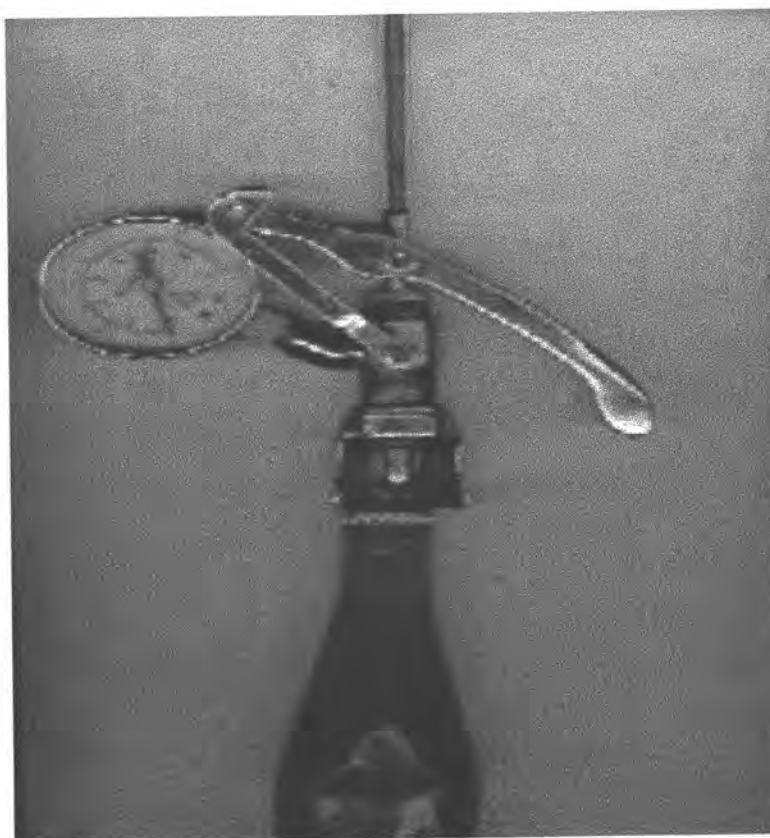
รายละเอียดของวัสดุอุปกรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

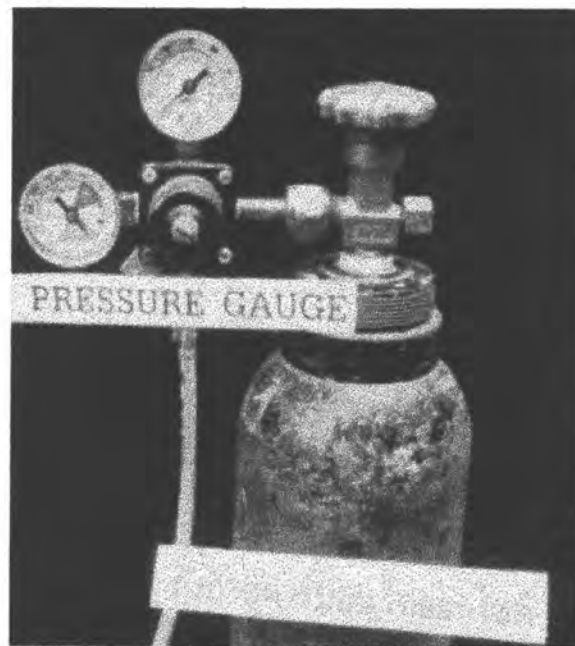
วัสดุอุปกรณ์	บริษัท : รุ่น
1. เครื่องตีปั่นผลไม้	Moulinex : blender Mill 2
2. อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า	DT Hetrothem : CB 60
3. เทอร์โมมิเตอร์	Digigon : DT
4. เครื่องชั่งละเอียด	Sartorius : A200S
5. เครื่องชั่งแบบหยาบ	Sartorius : BA4100S
6. เครื่องเซนตริฟิวจ์	Heraeus Christ : HC-D 12e/2r
7. นาฬิกาจับเวลา	Cannon : CT-10
8. เครื่องอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	วสันต์โลหะกิจ
9. ถังแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และเกจวัดความดัน	วสันต์โลหะกิจ
10. เครื่องปิดฝาจิบ	-
11. ฝาจิบ	ฝาจิบ จำกัด
12. pH meter	Schott : CG 840

ตารางที่ 8 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

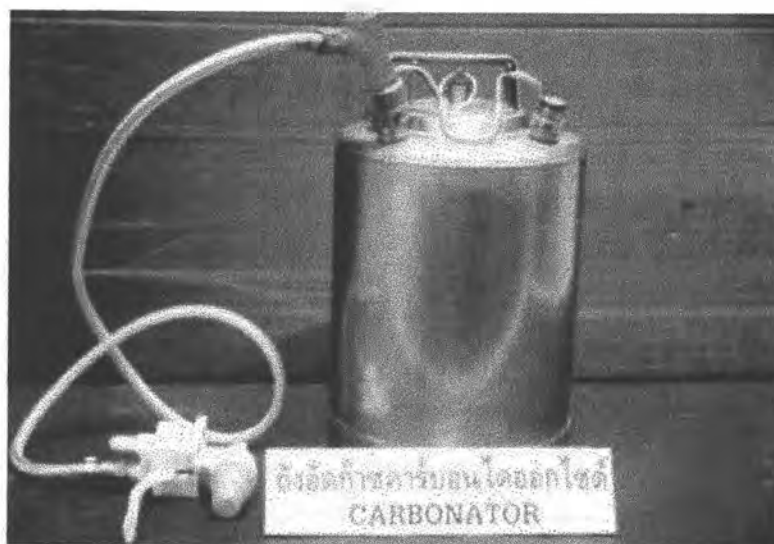
วัสดุอุปกรณ์	บริษัท : รุ่น
13. เครื่องวัดปริมาตรการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์	Gas volume tester
14. Spectrophotometer	Shimadzu : UV-240 Graphicord
15. หม้อนิ่งความดัน	Tommy : SS – 320
16. ตู้บ่มเชื้อ	Memmert : B 20
17. Hand refractometer	ATAGO : N1



รูปที่ 9 เครื่องวัดปริมาตรการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 10 ถังก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 11 ถังอัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 วิเคราะห์วัตถุดิบ คือ องค์ประกอบของเนื้อมะขามหวานและกิจกรรมของเอนไซม์

3.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของเนื้อมะขามหวาน

เลือกวิเคราะห์องค์ประกอบของเนื้อมะขามหวาน เพื่อเป็นข้อมูลในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมวัตถุดิบสำหรับย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในการผลิตน้ำเชื่อมมะขาม ดังนี้

3.1.1.1 ความชื้น วิเคราะห์โดยวิธีของ Hart และ Fisher (1971) รายละเอียดตามภาคผนวก ข 1.

3.1.1.2 เฟอร์เร็นต์ของของแข็งที่ละลายได้วิเคราะห์โดยวิธีของกองบรรณธิการเฉพาะกิจฐานเกษตรกรรม (2530)รายละเอียดตามภาคผนวก ข 2

3.1.1.3 ค่าความเป็นกรด วิเคราะห์โดยวิธี AOAC 947.05, 1990 รายละเอียดตามภาคผนวก ข 3

3.1.1.4 ปริมาณเพคติน วิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีของ McComb และ McCready (1952) รายละเอียดตามภาคผนวก ข 4

3.1.2 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมมะขาม เพื่อกำหนดปริมาณในการย่อยสลายเนื้อมะขามสด โดยวิเคราะห์กิจกรรม ในเทอมของหน่วยเอนไซม์ต่อน้ำหนักเนื้อมะขามสด 100 กรัม กำหนดนิยาม ดังนี้

1 หน่วย เอนไซม์เพคตินเอส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ลดความหนืดสารละลายเพคติน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลวร้อยละ 50 ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก2.1

1 หน่วย เอนไซม์เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ลดความหนืดของสารละลายคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลวร้อยละ 50 ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก2.2

3.2 หากภาวะกระบวนการผลิตน้ำเชื่อมมะขามหวานพันธุ์สีทอง โดยใช้เอนไซม์เพคตินเอส และเซลลูเลส ทำปฏิกิริยาภายใต้ภาวะตามลำดับ การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะขามโดยผสมเนื้อมะขาม

1 ส่วนต่อน้ำ 1 ส่วน ผสมเป็นเนื้อเดียว ได้เป็นเนื้อมะขามบด จากนั้นนำมาสกัดน้ำเชื่อมมะขาม ด้วยเพคตินเนสและเซลลูเลส โดยการทดลองเป็นลำดับดังนี้

3.2.1 ทาภาวะสำหรับเพคตินเนสในการย่อยสลายเพคตินในเนื้อมะขามบด

จากเนื้อมะขามบดที่ได้โดยการบดเนื้อมะขามหวานผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิห้อง จนได้เป็นเนื้อเดียวกันนำมาย่อยสลายด้วยเพคตินเนสที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.25, 0.5 และ 0.75 หน่วยต่อเนื้อมะขามบด 100 กรัม นำไปย่อยในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบ เขย่าได้ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แปรระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 1-5 ชั่วโมง แยก น้ำเชื่อมมะขามด้วยการกรองผ่านผ้าขาวบางด้วยแรงกดของลูกตุ้มเหล็กหนัก 70 กรัมต่อลูกบาศก์ เซนติเมตร ปริมาณของน้ำเชื่อมมะขามที่สกัดได้ คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักเนื้อมะขามบด

ออกแบบการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 3x5 และ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (Snedecor และ Cochran, 1967) ทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2 ทาภาวะสำหรับเซลลูเลสในการย่อยเนื้อมะขามบดที่ผ่านการย่อยเพคตินจากเนื้อ มะขามบดของเอนไซม์เพคตินเนสในข้อ 3.2.1

จากเนื้อมะขามบดที่ผ่านการย่อยด้วยเพคตินเนสที่สามารถสกัดน้ำเชื่อมมะขาม หวานสูงสุด จากข้อ 3.2.1 นำมาย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเซลลูเลส ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.25 และ 0.5 หน่วยต่อเนื้อมะขามบด 100 กรัม นำไปย่อยในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบ เขย่าได้ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แปรระยะเวลาในการย่อยระหว่าง 1-5 ชั่วโมง ประเมินผล จากปริมาณน้ำเชื่อมมะขามที่สกัดได้ โดยการกรองผ่านผ้าขาวบางด้วยแรงกดของลูกตุ้มเหล็กหนัก 70 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.2.2 ปรับปรุงความใสของน้ำเชื่อมมะขามที่สกัดด้วยเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.2.2 และ น้ำเชื่อมมะขามที่ไม่ใช่เอนไซม์สกัด ด้วยการเซนตริฟิวจ์ ด้วยแรงเหวี่ยง 40160 x g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี และกายภาพของน้ำเชื่อม มะขามดังต่อไปนี้

3.2.3.1 ร้อยละของของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ Hand Refractometer

3.2.3.2 วัดค่าความใสในรูปของเปอร์เซ็นต์การส่องผ่านของแสงที่ความยาวคลื่น

660 นาโนเมตร ภาคผนวก ข 5

3.2.3.3 ร้อยละของปริมาณกรด (กรดทาร์ทาริก)

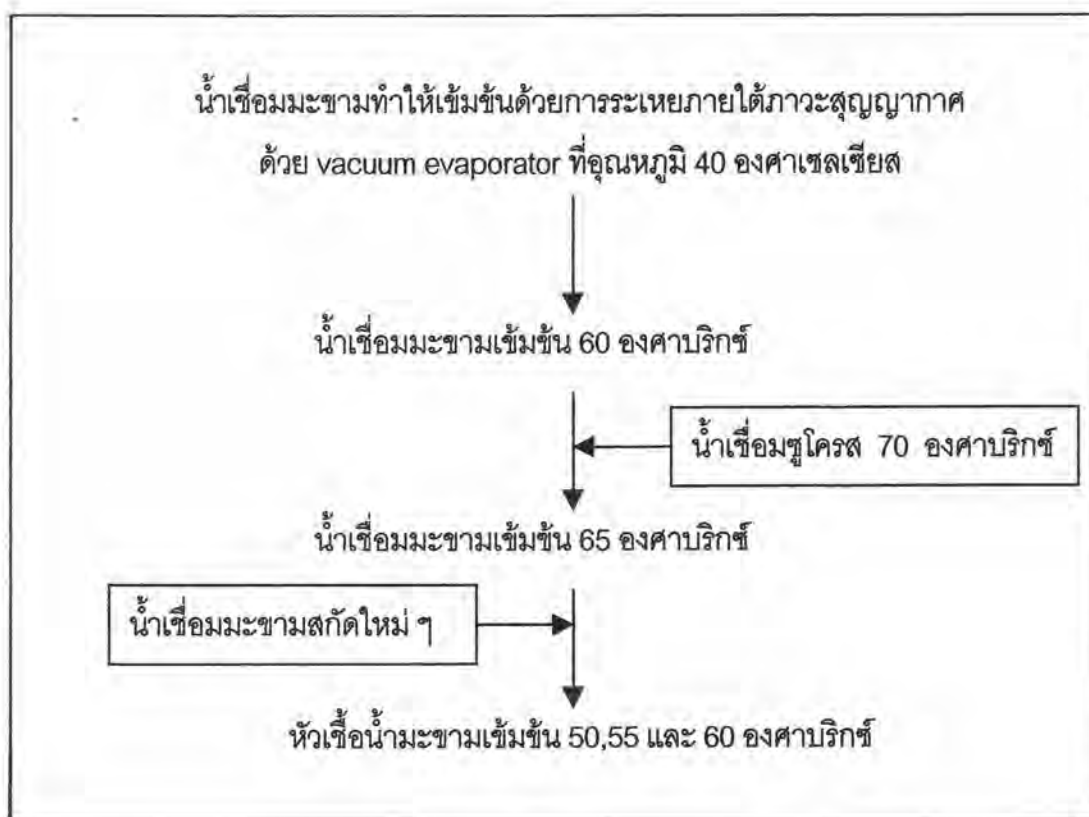
3.2.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter

3.2.3.5 ปริมาณสารฟีนอลิก ในรูป สารแทนนิน วิเคราะห์โดยวิธี ของ Singleton และ Rossi (1965) รายละเอียดตามภาคผนวก ข 6

3.2.3.6 วัดค่าสี โดยใช้ Chroma meter

3.3 ประเมินหาภาวะการทำหั่วเขื่อน้ำมะขามเข้มข้นสำหรับน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส

3.3.1 เตรียมหั่วเขื่อน้ำมะขาม แสดงรายละเอียด ได้ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 ขั้นตอนการเตรียมหั่วเขื่อน้ำมะขาม

จากรูปที่ 12 นำน้ำเชื่อมมะขามหวานที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์และ ผ่านการทำให้ใสด้วยการเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ แล้วทำให้เข้มข้นด้วย vacuum Evaporater ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ได้น้ำเชื่อมมะขามเข้มข้น 60 องศาบริกซ์ ปรับด้วยน้ำเชื่อม 70 องศาบริกซ์ ให้ได้น้ำเชื่อมมะขามเข้มข้น 65 องศาบริกซ์ แล้วเติมน้ำเชื่อมมะขามหวานที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์และผ่านการทำให้ใสด้วยการเซนตริฟิวจ์ ให้ได้หัวเชื่อมมะขามเข้มข้น 3 ระดับ คือ 50, 55 และ 60 องศาบริกซ์ รายละเอียดการคำนวณดังในภาคผนวก จ แล้วนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดมาตรวจสอบคุณภาพโดยเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนี้

3.3.1.1 แทนนิน

3.3.1.2 ค่าสีน้ำตาล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดังในภาคผนวก ข7

3.3.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.3.1.4 ปริมาณกรดในรูปกรดทาร์ทาริก

3.3.1.5 ปริมาณร้อยละของของแข็งที่ละลายได้

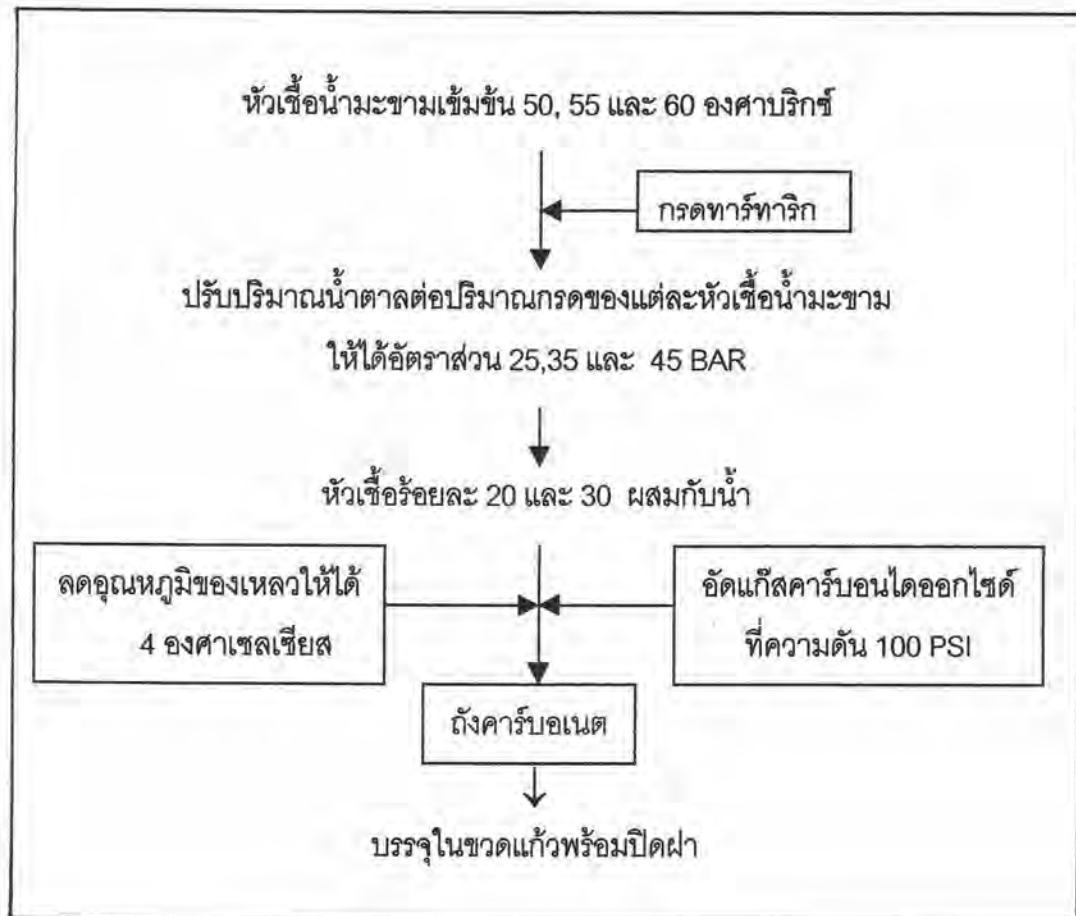
3.3.2 ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ คือ น้ำเชื่อมมะขามที่ผ่านการสกัด ในข้อ 3.2.2 น้ำเชื่อมมะขามเข้มข้นด้วยการระเหยภายใต้ภาวะสูญญากาศจนได้ 60 องศาบริกซ์ หัวเชื่อมมะขามเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 50, 55 และ 60 องศาบริกซ์ ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น โดยใช้ Scoring Test ตามวิธีการที่อธิบายไว้ใน ภาคผนวก จ 2.1 ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Snedecor และ Cochran ,1967) ทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.3 หาสูตรทำหัวเชื่อมมะขามที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ คือ 50 , 55 และ 60 องศาบริกซ์ ที่ได้จากข้อ 3.3.1 สำหรับผลิตเป็นเครื่องดื่มมะขามอัดแก๊ส

โดยปรับปรุงรสชาติของหัวเชื่อมด้วยการเติมกรดทาร์ทาริก ให้ได้อัตราส่วนของปริมาณน้ำตาลต่อปริมาณกรด (BAR) 3 ระดับ คือ 45, 35 และ 25 BAR หาปริมาณของหัวเชื่อมมะขามเข้มข้นที่จะเตรียมเป็นน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส โดย แปรปริมาณหัวเชื่อมที่เตรียมได้ 2 ระดับ คือร้อยละ 20 และ 30 ผสมกับน้ำในถังคาร์บอนเตเตอร์ แสดงในรูปที่ 11 ใช้น้ำแข็งหล่อข้างถังเพื่อลดอุณหภูมิของเหลวผสมในถังคาร์บอนเตเตอร์ให้ได้ 4 องศาเซลเซียส อัดแก๊ส

คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งบรรจุอยู่ในถังบรรจุแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่อเชื่อมกับถังคาร์บอนเตเตอร์อัดแก๊สด้วยความดัน 100 PSI แสดงขั้นตอนการเตรียมน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ขั้นตอนการเตรียมน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส

ประเมินผลดังนี้

- 3.3.3.1.1 ประเมินผลทางด้านกายภาพ ได้แก่
 - 3.3.3.1.1 ร้อยละของของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์)
 - 3.3.3.1.2 ค่าความเป็นกรดต่าง
 - 3.3.3.1.3 ปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้ วัดด้วยเครื่องวัด ปริมาตรการละลายของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงในรูปที่ 9

3.3.3.2 ประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัส

เพื่อหาสูตรที่ดีที่สุดของแต่ละหัวเขื่อนน้ำมะขามเข้มข้น โดยวิธี Ratio Profile Test ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง 2.2 จากผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Snedecor และ Cochran, 1967) ทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.3.3 ประเมินผลด้านความพอใจ

นำสูตรที่เข้าใกล้ผลิตภัณฑ์อุดมคติมากที่สุดของแต่ละหัวเขื่อนน้ำมะขามเข้มข้น 3 ระดับ คือ 50, 55 และ 60 องศาบริกซ์ ที่ได้จากการประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัส จากข้อ 3.3.3.2 มาคัดเลือกสูตรที่ผู้บริโภคพอใจมากที่สุด โดยทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ preference Test ตามรายละเอียดภาคผนวก ง 2.3 ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 30 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.2

3.4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาหัวเขื่อนน้ำมะขามเข้มข้นและน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส

ในงานวิจัยนี้เลือกศึกษาอายุการเก็บเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการประเมินว่าพอใจสูงสุด จากข้อ 3.3.3.3

3.4.1 ผลของการใช้สารกันเสียและอายุการเก็บของหัวเขื่อนน้ำมะขามเข้มข้นที่เตรียมได้ เตรียมหัวเขื่อนน้ำมะขามที่ผู้บริโภคพอใจมากที่สุด คือ หัวเขื่อนที่มีปริมาณของของแข็งที่ละลายได้ 55 องศาบริกซ์ อัตราส่วนปริมาณน้ำตาลต่อปริมาณกรด 35 BAR นำมาศึกษาปริมาณสารกันเสีย คือ โซเดียมเบนโซเอตโดยแปรปริมาณ 4 ระดับ คือ 0, 250, 500 และ 750 ppm. บรรจุหัวเขื่อนเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 280 มิลลิลิตร เก็บหัวเขื่อนไว้ที่อุณหภูมิเย็นประมาณ 5 ± 2 องศาเซลเซียส โดยจะวิเคราะห์คุณภาพหลังจากเตรียมเสร็จใหม่ และต่อไปอีกทุกๆ 1 เดือน รวมเป็นเวลา 3 เดือน ค่าที่วิเคราะห์ดังต่อไปนี้

3.4.1.1 การเกิดสีน้ำตาลของหัวเขื่อนน้ำมะขาม

3.4.1.2 จำนวนเชื้อยีสต์และรา ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ค

3.4.1.3 ทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส ด้าน สี กลิ่น รสชาติ และ ความชอบ

รวม ด้วยแบบทดสอบความชอบ ชนิด hedonnic scaling โดยดำเนินการตามภาคผนวก ง 2.3 ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 30 คน

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 4x4 ทดลอง 2 ซ้ำวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New multiple Range Test (Snedecor และ Cochran, 1967) การทดสอบทางประสาทมัลติสวางแผนแบบ Factorial randomized complete block

3.4.2 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส

หัวเชื้อน้ำมะขามเข้มข้นที่เตรียมได้ จากข้อ 3.4.1 นำมาผลิตเป็นน้ำมะขามพร้อมดื่มอัดแก๊ส โดยบรรจุน้ำมะขามอัดแก๊สที่ผลิตได้ในขวดแก้วขนาด 280 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยประเมินผลคุณภาพของน้ำอัดลมทุกๆ 2 สัปดาห์ ดังนี้

3.4.2.1 ประเมินผลคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ต่อไปนี้

3.4.2.1.1 การเกิดสีน้ำตาล

3.4.2.1.2 ปริมาตรแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายได้

3.4.2.2 ตรวจสอบจำนวนยีสต์และรา

3.4.2.3 ตรวจสอบคุณภาพทางด้านประสาทมัลติส

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New multiple Range Test (Snedecor และ Cochran, 1967) การทดสอบทางประสาทมัลติสวางแผนแบบ Randomized Complete Block Design

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT