บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

ปลาทับทิม ซื้อจากแพปลาปิติ สะพานปลา กรุงเทพ ฯ นำมายังห้องทดลองโดยดองด้วยน้ำแข็ง บรรจุในกล่องโฟมเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 4 ^{o}C ปลาที่ใช้มีน้ำหนักและความยาวโดยเฉลี่ย 700-800 กรัม และ 26-32 เซนติเมตร ตามลำดับ

สารเคมี

สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และกายภาพ

- Boric acid	Merck	AR. grade
- Bromocresol green	Ajex	LAB grade
- Copper sulfate anhydrous ($CuSO_4$)	Univar	AR. grade
- Ethanol	Carlo Erba	AR. grade
- Formaldehyde solution, 37 % (CH_2O)	Scharlau	AR. grade
- Hydrochloric acid, 37% (HCl)	Fisher scientific	AR. grade
- Magnesium carbonate, light ($3MgCO_3 .Mg(OH)_2 .3H_2O$)	Unilab	AR. grade
- Methyl red	Merck	AR. grade
- Petroleum ether, bp. 40-60 ^{o}C	Carlo Erba	AR. grade
- Potassium carbonate anhydrous ($K_2 CO_3$)	Unilab	AR. grade
- Potassium chloride (KCl)	Univar	AR. grade
- Potassium sulfate anhydrous (K_2SO_4)	Univar	AR. grade
- Sodium hydroxide anhydrous (NaOH)	Carlo Erba	AR. grade
- Sulfuric acid, 96% (H_2SO_4)	Carlo Erba	AR. grade
- Trichloroacetic acid (TCA)	Merck	AR. grade

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับใช้ในขั้นตอนการผลิตซูริมิ

- Sodium chloride (NaCl)	Carlo Erba	AR. grade
- D-sorbitol powder ($CH_2OH(CHOH)_4CH_2OH$)	Asia Pacific Specialty Chemicals	LAB grade
- Sodium tripolyphosphate (STPP)		Food grade
- น้ำตาลทราย		จากบริษัทมิตรผล จำกัด

สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Modified Lowry's Method

- Bovine serum albumin (BSA)		
- Copper sulphate pentahydrate ($CuSO_4.5H_2O$)	Univar	AR. grade
- Folin-Ciocalteu phenol reagent	Carlo Erba	AR. grade
- Potassium tartrate	Univar	AR. grade
- Sodium carbonate	Univar	AR. grade
- Sodium deoxycholate (DOC)	Fluka	AR. grade
- Sodium dodecyl sulfate	plusone® pharmacia biotech	AR. grade
- Sodium hydroxide anhydrous	Carlo Erba	AR. grade
- Trichloroacetic acid (TCA)	Merck	AR. grade

สำหรับการทำ gel electrophoresis

- Acrylamide, 40 % solution		
- Ammonium persulfate ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Amersham international	AR. grade
- Glacial acetic acid, (CH_3COOH)	Carlo Erba	AR. grade
- Bromophenol blue	Merck	AR. grade
- Coomassie blue R-250	Fluka	AR. grade
- Glycerol	Carlo Erba	AR. grade
- Glycine ($H_2NCH_2CO_2H$), pure	USB™	AR. grade
- Hydrochloric acid, 37% (HCl)	Fisher Scientific	AR. grade
- Methyl alcohol (CH_3OH)	Carlo Erba	AR. grade
- 2-Mercaptoethanal ($HSCH_2CH_2OH$)	plusone® pharmacia biotech.	AR. grade

- Sodium dodecyl sulphate, SDS
  ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) plusone® pharmacia biotech. AR. grade
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) USB™ AR. grade
- Tris (hydromethyl) amino methane
  ($NH_2C(CH_2OH)_3$) USB™ AR. grade
- Sigma molecular weight marker
  (wide molecular range, M 4038) Sigma

สารปรุงแต่งอาหาร (additive) ที่ใช้

- Spray dried beef plasma (AMP 600N มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 71.1 %) ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก บริษัท ITS international จำกัด นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา
- Egg white powder (ovogel ชนิด high gel มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 80 %) ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก บริษัทเฮล์มมหาบุญจำกัด นำเข้าจากประเทศฝรั่งเศส
- Transglutaminase (Activa- TG) ได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างจาก บริษัทอายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น
- L-Ascorbic acid (sodium salt) จากบริษัท SERVA Electrophoresis ประเทศเยอรมัน

อุปกรณ์

สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

- ตู้อบ 100 -110 °C model 600, Memert, Germany
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง model A 200s, Sartorious, Germany
- ชุดวิเคราะห์โปรตีน Kjeldathem and Vapodest I; Gerhardt, KT 85, Germany
- เครื่องวิเคราะห์ไขมัน model 2050, Soxtec Automatic Extraction
- pH meter model F-21, Horiba, Japan
- Conway jar microunit Standard type, Sibata, Japan

สำหรับเตรียมซูริมิ

- เครื่องบดเนื้อ ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm. A-9070, Kenwood, USA

- เครื่องผสมอาหาร A-9070, Kenwood, USA
- Screw press บริษัทกิตติวัฒนา, ประเทศไทย
- ตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ –18 °C Heto Lab equipment DT, Denmark
- Water bath model MS/2, MGW Lauda , France

สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Modified Lowry's Method

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง model IEC multi-RF, Thermo IEC, USA
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง model UV-240, Shimadzu, Japan

สำหรับการทำ gel electrophoresis

- ชุดวิเคราะห์ protein pattern ด้วย SDS-PAGE ประกอบด้วย
  - Electrophoresis and electrotransfer unit, Hoefer mini VE, amersham pharmacia biotech, Sweden
  - Electrophoresis power supply EPS 301, amersham pharmacia biotech, Sweden
- Hamilton Syringe Microliter™ syringes ขนาด 25 µl

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของเนื้อปลาสด และซูริมิจากปลาทับทิม

ปลาที่ใช้ในการศึกษาคือ ปลาทับทิม เป็นปลาที่ซื้อจากสะพานปลากรุงเทพ ฯ และเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (0-4 °C) โดยการดองน้ำแข็งก่อนนำมาทำการวิจัย

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของเนื้อปลาทับทิมสด โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อปลา เลือกเฉพาะส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อขาว (white muscle) มาบดให้ละเอียด ก่อนนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.1.1 ค่า Total volatile base-nitrogen (TVB-N) และค่า Trimethylamine (TMA-N) โดยวิธี Conway's method (Ng, 1987) การวิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.1.3 ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1995) การวิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.1.4 ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1995) การวิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.1.5 ปริมาณไขมัน (A.O.A.C., 1995) การวิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.2 การเตรียมซูริมิ

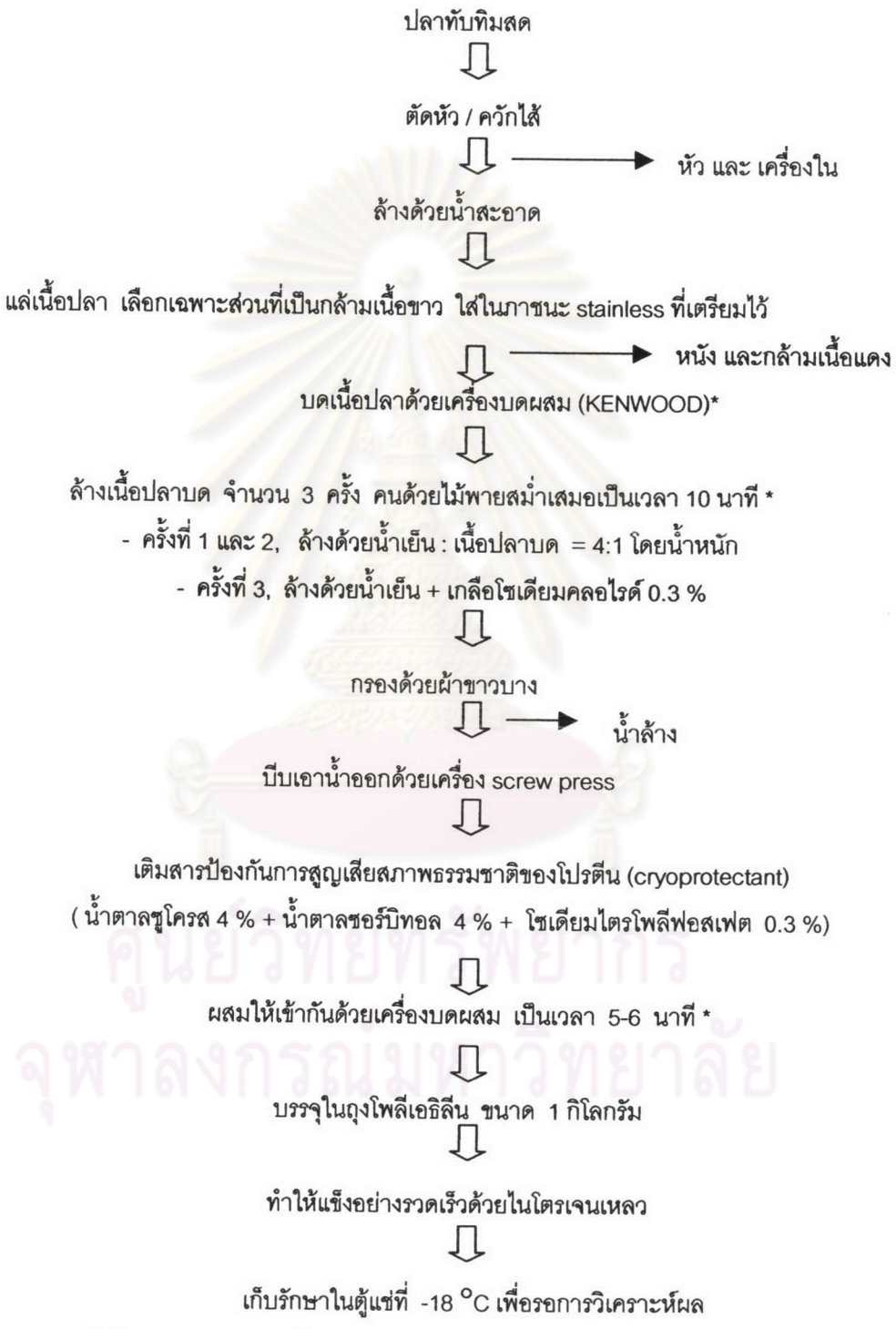
นำปลาทับทิมสดที่เก็บในน้ำแข็งมาล้างให้สะอาด ตัดหัว ควักไส้ แล่เนื้อปลา (เลือกใช้เฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อขาว) บดด้วยเครื่องบดผสมให้ละเอียด ซึ่งจะได้เนื้อปลาบด (minced fish) นำเนื้อปลาบดมาล้างด้วยน้ำเย็น (อุณหภูมิประมาณ 4-5°C) 3 ครั้ง โดยในน้ำสุดท้ายล้างด้วยสารละลาย 0.3 % NaCl อัตราส่วนของเนื้อปลาบด : น้ำผสมน้ำแข็งที่ใช้เป็น 1 : 4 โดยน้ำหนัก และควบคุมอุณหภูมิน้ำให้ต่ำกว่า 10 °C ในการล้างแต่ละครั้งใช้เวลา 10 นาที โดย 5 นาทีแรกกวนน้ำและเนื้อปลาบดให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้อีก 5 นาทีเพื่อให้เนื้อปลาบดและน้ำแยกชั้น จากนั้นแยกเนื้อปลาบดในการล้างแต่ละครั้งด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น และเมื่อล้างครั้งสุดท้ายแล้วบีบน้ำออกด้วยเครื่อง screw press จากนั้นนำเนื้อปลาบดมาผสมกับสารป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (cryoprotectant) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส (sucrose) ซอร์บิทอล (sorbitol) และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (sodium tripolyphosphate) 4.0, 4.0 และ 0.3 % ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องบดผสมเป็นเวลา 5-6 นาที ระหว่างสับผสมควบคุมอุณหภูมิของเนื้อปลาบดให้ต่ำกว่า 10°C จากนั้นนำเนื้อปลาบดที่ได้บรรจุถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน (PE) ก้อนละ 1 กิโลกรัม นำไปแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว และเก็บในตู้แช่ที่ -18±2 °C ก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 3.1)

3.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปรากฏการณ์ suwari และ modori ของซูริมิจากปลาทับทิม

ขั้นตอนการเตรียมเจลก่อนนำมาวิเคราะห์มีดังนี้

นำตัวอย่างซูริมิแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง (ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที) จนอุณหภูมิของตัวอย่างประมาณ 0-4 °C จากนั้นบดผสมกับ NaCl ปริมาณ 2.5 % ของน้ำหนักซูริมิ ด้วยเครื่องสับผสมเป็นเวลา 5-6 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 10 °C ปรับความชื้นของตัวอย่างให้เท่ากับ 80 % บรรจุตัวอย่างที่เตรียมได้ในท่อสแตนเลส (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ยาว 3 ซม.) ปิดหัวท้ายด้วยแผ่นยางและแผ่นสแตนเลส (ขนาด 3x3 ซม.) รัดด้วยยางเส้นให้แน่น จากนั้นนำมาให้ความร้อนแบบ 2-step heating การให้ความร้อนในช่วง

แรกแปรระดับอุณหภูมิในช่วงการ set เจลเป็น 7 ระดับคือ 35 40 45 50 55 60 และ 65°C เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็น (4 °C) นำเจลซูริมิที่ได้เก็บในตู้เย็น (4 °C) นาน 1 คืน (รูปที่ 3.2)



หมายเหตุ : * หมายถึง ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 10 °C

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมซูริมิสำหรับใช้ในการทดลอง

ซูริมิแช่แข็ง

⇩

ละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จนอุณหภูมิประมาณ 0-4 °C

⇩

บดผสมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5 % เป็นเวลา 5-6 นาที

⇩

ปรับความชื้นด้วยน้ำแข็งให้ได้ 80%

⇩

บรรจุในท่อสแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซ.ม ยาว 3 ซ.ม

⇩

นำไปให้ความร้อนแบบ 2-step heating

setting ที่ 35 40 45 50 55 60 และ 65 °C นาน 30 นาที

cooking ที่ 90 °C นาน 20 นาที

⇩

ทำให้เย็นในน้ำผสมน้ำแข็ง

⇩

นำเจลซูริมิที่ได้เข้าเก็บในตู้เย็น (4 °C) เป็นเวลา 1 คืน

⇩

นำมาวิเคราะห์คุณภาพเจล

(ค่า gel strength ค่าสี และค่า folding test)

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมเจลซูริมิสำหรับวิเคราะห์ setting temperature

ในแต่ละการทดลอง ทำ 2 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์สมบัติดังนี้

3.3.1 ค่า gel strength ดัดแปลงตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2002) โดยนำตัวอย่างเจลซูริมิ ออกจากตู้เย็น วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อปรับอุณหภูมิตัวอย่างให้เท่ากับอุณหภูมิห้อง (25°C) ก่อนนำไปวัดค่า force และ deformation ด้วยเครื่อง texture analyzer (Model TA-XT2, Stable Micro System, Surrey, UK) โดยใช้หัววัดแบบกดปลายมน (spherical plunger) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm. กำหนดให้อัตราเร็วของหัววัดคงที่ที่ 1.1 mm./s ตัวอย่างเจลจะถูกกดด้วยหัวกดจนกระทั่งผิวหน้าแตก น้ำหนักที่กดคือ แรง (force) หรือค่าความแข็งของเจล แสดงค่าเป็นกรัม ส่วนความลึกหรือระยะทางที่หัวกดกดลงในตัวอย่าง

จนแตกคือ deformation หรือค่าความยืดหยุ่นของเจล แสดงค่าเป็นเซนติเมตร ในแต่ละ treatment จะวัดทั้งหมด 7 ครั้ง จากนั้นตัดค่าสูงสุดและต่ำสุดออก แล้วนำค่าที่เหลือ 5 ค่า มาหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณค่า gel strength ดังนี้

gel strength (g.cm) = force (g) x deformation (cm.)

3.3.2 ค่า folding test ตามวิธีของ Lanier (1992) โดยตัดตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดหนา 3 มิลลิเมตร วิเคราะห์ค่า folding test ของตัวอย่างโดยการพับ และประเมินผลตามตารางที่ 2.3 (หน้า 15)

3.3.3 ค่าสี วัดสีระบบ CIE L*a*b* โดยใช้เครื่อง Minolta CR-300 Series, Japan โดยใช้ D65 เป็นแหล่งกำเนิดแสง มุมการมอง 10 $^{\circ}$ จากนั้นคำนวณค่า whiteness ตามวิธีการของ Park (1994)

whiteness (%) = L* - 3b*

วางแผนการทดลองแบบ Completely Ramdomized Design (CRD) เพื่อวิเคราะห์ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเกิดปรากฏการณ์ suwari และ modori ของซูริมิ

3.4 ศึกษาผลของเวลาต่อการเกิดปรากฏการณ์ suwari และ modori ของซูริมิจากปลาทับทิม

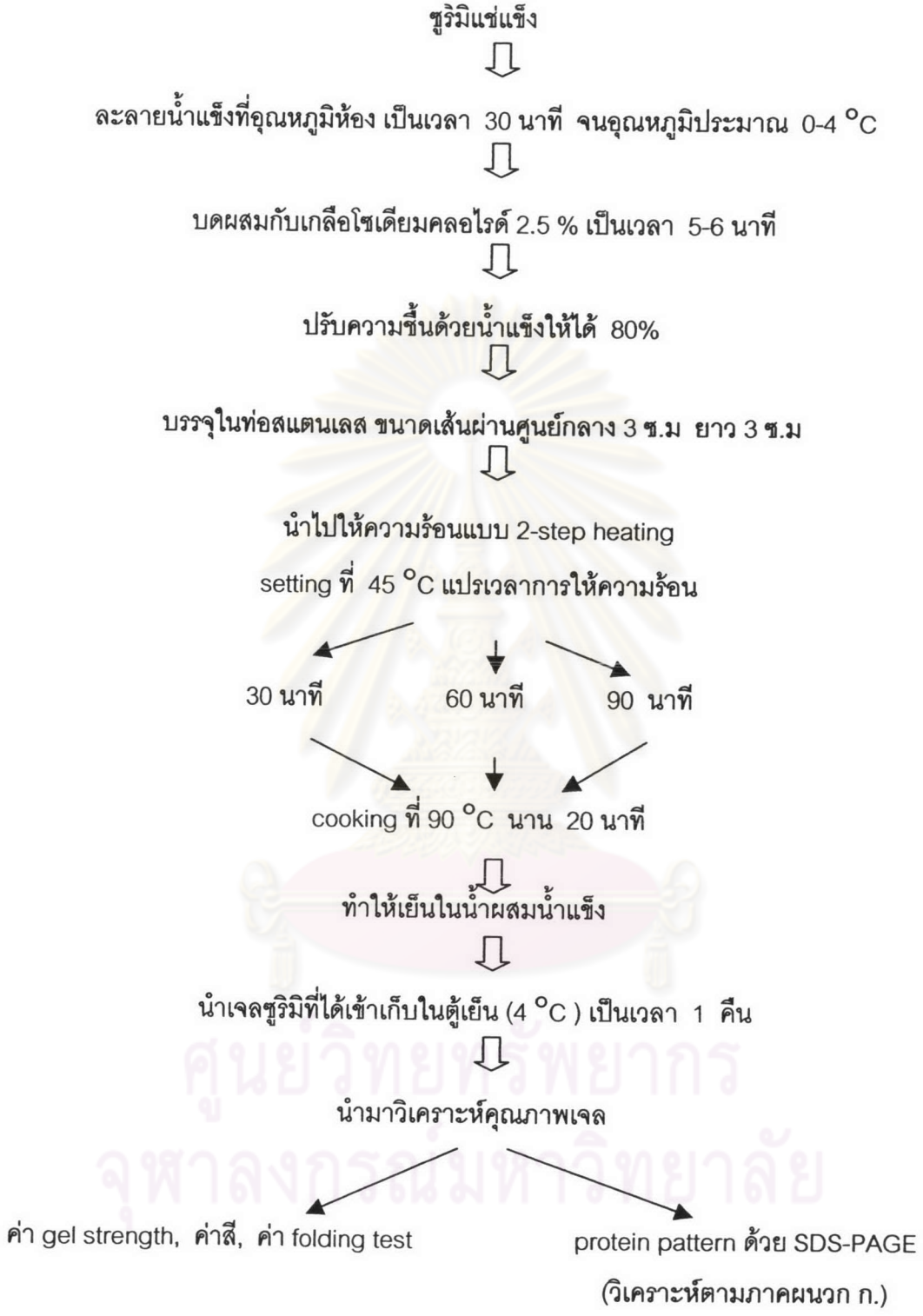
การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลองดังรูปที่ 3.3 โดยการให้ความร้อนในช่วงแรก แปรเวลาการ set เจล เป็น 3 ระดับ คือ 30 60 และ 90 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 90 $^{\circ}$C เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิที่เลือกใช้คือ 45 $^{\circ}$C และ 65°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการเกิด suwari และ modori ตามลำดับที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 หลังจากเกิดเจลแล้วเก็บตัวอย่างในตู้เย็น (4 $^{\circ}$C) ข้ามคืน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ดังนี้

3.4.1 ค่า gel strength ดัดแปลงตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2002) โดยเตรียมตัวอย่างเจลซูริมิสำหรับวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1

3.4.2 ค่า folding test ตามวิธีของ Lanier (1992) เตรียมตัวอย่างเจล เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2

3.4.3 ค่าสี โดยวัดสีระบบ CIE L*a*b* เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3

วางแผนการทดลองแบบ CRD เพื่อวิเคราะห์ผลของเวลาต่อการเกิดปรากฏการณ์ suwari และ modori ของตัวอย่างเจล



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการเตรียมเจลซูริมิสำหรับวิเคราะห์ setting time

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพเจลซูริมิจากปลาทับทิม

ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของเจลซูริมิโดยการเติมวัตถุเจือปนอาหาร โดยวัตถุเจือปนอาหารที่นำมาใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย

3.5.1 Microbial transglutaminase (MTGase) แปรปริมาณการเติมเป็น 3 ระดับคือ 0.1 0.2 และ 0.3 % (w/w) ของน้ำหนักซูริมิ

3.5.2 Sodium ascorbate (SA) แปรปริมาณการเติมเป็น 3 ระดับคือ 0.1 0.2 และ 0.3 % (w/w) ของน้ำหนักซูริมิ

3.5.3 Beef plasma protein (BPP) แปรปริมาณการเติมเป็น 3 ระดับคือ 1.0 2.0 และ 3.0 %(w/w) ของน้ำหนักซูริมิ

3.5.4 Egg white (EW) แปรปริมาณการเติมเป็น 3 ระดับคือ 1.0 2.0 และ 3.0 % (w/w) ของน้ำหนักซูริมิ

โดยเติมวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิดในปริมาณที่กำหนดลงในขั้นตอนการบดผสม พร้อมกับเกลือ NaCl แล้วนำไปให้ความร้อนตามระดับอุณหภูมิและเวลาที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 (ภาวะที่ให้เจลแข็งแรงที่สุด) ศึกษาโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างซูริมิที่ไม่เติมวัตถุเจือปนอาหาร (control) วิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ตามข้อ 3.4.1-3.4.3 ค่า Expressible water และ ค่า Water holding capacity (WHC) ตามวิธีของ Park (2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก. เพื่อเลือกระดับที่เหมาะสมของวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิด โดยพิจารณาจากค่า gel strength และ ค่าสี ที่เหมาะสม วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัวอย่าง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992) จากนั้นตรวจสอบ protein pattern โดยการใช้ SDS-PAGE ดัดแปลงตามวิธีของ Yongsawatdigul และคณะ (2000) วิเคราะห์ตามวิธีในภาคผนวก ก.

3.6 เปรียบเทียบคุณภาพเจลซูริมิที่ได้จากการทดลองกับเจลซูริมิที่ผลิตทางการค้า (คามาโบโกะขาว)

เลือกระดับที่เหมาะสมของวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิด sodium ascorbate (SA) microbial transglutaminase (MTGase) beef plasma protein (BPP) และ egg white (EW) จากข้อ 3.5 มาเตรียมเป็นเจลซูริมิ ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ศึกษาเปรียบเทียบกับซูริมิที่ผลิตทางการค้า โดยทำการประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

3.6.1 การประเมินลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี penetration test วัดค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) ค่าความแข็ง (force) และความยืดหยุ่น (deformation) ดังแสดงในข้อ 3.3.1

3.6.2 การประเมินลักษณะเนื้อสัมผัสโดยวิธี texture profile analysis (TPA) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่เลียนแบบการเคี้ยวของมนุษย์ โดยเครื่องจะทำการกดลงบนอาหาร 2 ครั้ง และแสดงผลในรูปของกราฟระหว่างค่าแรง (g) และเวลา (sec.) โดยประเมินค่าความแข็ง (hardness) ความยืดหยุ่น (springiness) และความสามารถในการยึดเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) โดย

ความแข็ง (hardness) ได้จากความสูงของ force peak ที่ได้จากการวัดครั้งแรก ในความหมายทางประสาทสัมผัส หมายถึงแรงที่กระทำต่ออาหารทำให้อาหารแตกหรือแยกออก

ความยืดหยุ่น (springiness) เป็นระยะทางที่อาหารคืนตัวสู่ความสูงเดิมในระหว่างเวลาที่จบการทดสอบในครั้งที่ 1 และเริ่มการทดสอบในครั้งที่ 2 ในความหมายทางประสาทสัมผัส หมายถึงระดับความสามารถในการคืนตัวกลับมาเหมือนเดิมเมื่อมีการถอนแรงกดออกไปจากตัวอย่างอาหารที่ทำการทดสอบ

ความสามารถเกาะรวมกัน (cohesiveness) เป็นอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของการกดครั้งแรกกับการกดครั้งที่ 2 ในความหมายทางประสาทสัมผัส หมายถึงความแข็งแรงของพันธะภายในที่เกิดขึ้นในอาหารแล้วทำให้อาหารทนต่อการเปลี่ยนรูปได้ถึงระยะหนึ่ง ก่อนที่มันจะขาดแตกออกจากกันเป็นชิ้นย่อยเมื่อมีแรงภายนอกมากระทำ

3.6.3 การวัดค่าสี ด้วยเครื่องวัดสีระบบ CIE L*a*b* โดยเครื่อง Minolta CR-300 แหล่งกำเนิดแสง มุมการมอง 10°

3.6.4 การประเมินทางประสาทสัมผัส ใช้แบบทดสอบชนิด qualitative descriptive analysis with scaling (ช่วงสเกลตั้งแต่ 0-10) ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน จำนวน 16 คน แบบทดสอบที่ใช้มีรูปแบบดังภาคผนวก ค.

วางแผนการทดลองแบบ CRD (สำหรับการประเมินทางประสาทสัมผัส วางแผนการทดลองแบบ RCBD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1992)