บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเนคต้าฟักทอง

- ฟักทอง (*Cucurbita mosehata Decne*) พันธุ์พื้นเมือง ผลแก่จัด อายุประมาณ 120 วัน เปลือกสีเขียวปนเหลือง น้ำหนักประมาณ 3 กิโลกรัม/ลูก องค์ประกอบทางเคมีแสดงในภาคผนวก ก.3
- เอนไซม์เพคติเนส ชื่อทางการค้า Pectinex™ Ultra SP-L (Novo Nordisk Ferment) แอคติวิตี 26000 ยูนิต PG/มิลลิลิตร แสดงสมบัติใน ภาคผนวก ก.1 และวิธีวัดแอคติวิตี ในภาคผนวก ข.1
- สารให้ความคงตัว

  โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) ชื่อทางการค้า Satialgine® S20 (System BIO-INDUSTRIES) สมบัติแสดงในภาคผนวก ก.2.1

  คาราจีแนน (carrageenan) ชื่อทางการค้า Satiagum™ BDC20 (System BIO-INDUSTRIES) สมบัติแสดงในภาคผนวก ก.2.2
- น้ำตาลทรายขาว (บริษัทมิตรผล จำกัด)
- กรดมาลิก (Food grade)
- กรดซิตริก (Food grade)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบแอคติวิตีเอนไซม์เพคติเนส

- กรดโพลีกาแลคทูโรนิก (polygalacturonic acid) (Sigma P-3889)
- ไตรโซเดียมฟอสเฟต (trisodium phosphate) (AR grade)
- กรดซิตริก (citric acid) (AR grade)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) (AR grade)

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบแอคติวิตีเอนไซม์เพอออกซิเดส (peroxidase)

- กูไอคอล (guaiacol) (AR grade)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (AR grade)

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเบต้าแคโรทีน

- เบต้าแคโรทีนมาตรฐาน (Sigma C-4582)
- เตตระไฮโดรฟูราน (tetrahydrofuran) (HPLC grade)
- โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous) (AR grade)
- แมกนีเซียมคาร์บอเนต (magnesium carbonate) (AR grade)
- อะซีโตไนไตร์ (acetonitrile) (HPLC grade)
- ไดคลอโรมีเทน (dichoromethane) (HPLC grade)
- เมทานอล (methanol) (HPLC grade)

3.1.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด

- เอทานอล 95 % (ethanol 95%) (Lab grade)
- อะซีโตน (acetone) (AR grade)
- ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (disodium hydrogen phosphate anhydrous) (AR grade)
- โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (sodium dihydrogen phosphate anhydrous) (AR grade)
- เอนไซม์เทอมามิล (termamyl enzyme) (heat stable α-amylase No. 120L Novo Laboratories, Inc.)
- อะมัยโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) (Sigma A-9913)
- โปรติเอส (protease) (Sigma P-3910)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) (AR grade)
- กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) (AR grade)
- ซีไลท์ (celite) (AR grade)

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

- Plate count agar (DIFCO Laboratories USA)
- Potato dextrose agar (DIFCO Laboratories USA)

3.2 เครื่องมือ-อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องมือ-อุปกรณ์ในการผลิตเนคต้าฟักทอง

- เครื่องคั้นน้ำผลไม้ (VITA MIX; บริษัท รีเจ้นท์ เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด)
- เทอร์โมมิเตอร์แบบเสียบ (Digigon, DP-50)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) (DT Hetrotherm, CB 60)
- เครื่องชั่งละเอียด (Sartorious, A200S)
- เครื่องชั่งหยาบ (Sartorious, BA 4100S)
- ตะแกรงร่อนขนาด 25 เมช
- นาฬิกาจับเวลา (Cannon, CT-10)
- หม้อฆ่าเชื้อแบบตั้ง
- กระป๋องเคลือบแลคเกอร์ขนาด 202x308

3.2.2 เครื่องมือ-อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพเนคต้าฟักทอง

- Brookfield viscometer (DV II Plus) (รูปแสดงดังภาคผนวก ช.3)
- เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta : CT-310 series) (รูปแสดงดังภาคผนวก ช.4)
- High performance liquid chromatography (HPLC) (SHIMASU : UV Detector SPD-1)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (Hobira : F-1)
- รีแฟคโตมิเตอร์ (Abbe refractometer) (Ataco / 1T)

3.2.3 เครื่องมือ-อุปกรณ์ในการวิเคราะห์เส้นใยอาหารทั้งหมด

- ครูซิเบิลชนิดกรองเบอร์ 2 (filter crucible porosity No.2)
- ครูซิเบิล (crucible)
- อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl therm และ Vadopest 1, Gerhardt, KT 85)
- เครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) (Eyela A-3S)
- เดสสิเคเตอร์ (dessicator)

- เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) (Framo-Geratefechnik M22/1)
- เตาเผา (muffle furnace) (Carbolite, Mel 11-2)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (Hobira : F-1)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (WTE Binder, E 53)

3.2.4 <u>เครื่องมือ-อุปกรณ์ทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

- Cannon Fenske viscometer (รูปแสดงดังภาคผนวก ข.1)
- เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrar) (Framo-Geratefechnikl M22/1)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (Hobira F-1)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อุณหภูมิ 20 °C

3.2.5 <u>เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์</u>

- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (Tomy, SS-320)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Memmert, B 20)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการลวกฟักทอง</u>

นำฟักทองมาคว้านปอกเปลือก และคว้านไส้ แล้วหั่นเป็นชิ้นขนาด กว้างxยาวxหนา เป็น 3x10x1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เสียบเทอร์โมมิเตอร์ตรงจุดกึ่งกลางชิ้น นำไปลวกในน้ำเดือด โดยแปรอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางชิ้น (core temperature) เป็น 60 70 80 85 90 และ 95 °C ทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เพอออกซิเดสหลังการลวก (Pearson, 1970) ดังภาคผนวก ข.2

3.3.2 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์เพอออกซิเดส เพื่อย่อยเพคตินและเฮมิเซลลูโลสในเนื้อฟักทอง</u>

3.3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์และอุณหภูมิในการย่อยที่เหมาะสม

นำชิ้นฟักทองที่ผ่านการลวกในภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 1 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้ (VITA MIX) ชั่งเนื้อฟักทอง 100 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมเอนไซม์เพคติเนส (Pectinex Ultra SP-L) โดยแปรปริมาณเอนไซม์ 3 ระดับ คือ 2%

(38,841 ยูนิต/ 100 กรัม) 3 % (58,564 ยูนิต/100 กรัม) และ 4 % (77,687 ยูนิต/ 100 กรัม) โดยน้ำหนักแห้งของเนื้อฟักทอง คนผสมให้เข้ากัน ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30 40 และ 50 °C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันทีจนถึงอุณหภูมิประมาณ 25 °C ทำการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่เติมเอนไซม์

ประเมินผลเนื้อฟักทองที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ ดังนี้

3.3.2.1.1 วัดปริมาณเบต้าแคโรทีน โดย HPLC (Bureau และ Bushway, 1986) (ภาคผนวก ค.1)

3.3.2.1.2 วัดค่าความหนืด โดย Brookfield viscometer หัวเข็มเบอร์ 52

วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Design ขนาด 3x3 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.3.2.2 ศึกษาระยะเวลาในการย่อยและสัดส่วนเนื้อฟักทอง:น้ำ ในผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยใช้ความเข้มข้นและอุณหภูมิในการย่อยของเอนไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 แล้วแปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 4 ระดับ คือ 15 30 45 และ 60 นาที จากนั้นนำเนื้อฟักทองที่ผ่านการย่อยแล้วมากรองผ่านตะแกรงขนาด 25 เมช นำเนื้อฟักทองที่กรองได้มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เนคต้า โดยแปรสัดส่วนเนื้อฟักทอง:น้ำ เป็น 40:60 และ 50:50 (โดยน้ำหนัก) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์มีดังนี้

น้ำ + น้ำตาล 12 %w/w + กรดมาลิก 0.2 %w/w

↓

ต้มจนกระทั่งส่วนผสมละลาย

↓

ผสมเนื้อฟักทอง

↓

ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 65-70 °C เป็นเวลา 5 นาที

↓

เนคต้าฟักทอง

ประเมินผลผลิตภัณฑ์เนคต้าฟักทอง ดังนี้

3.3.2.2.1 วัดปริมาณเบต้าแคโรทีน โดย HPLC (Bureau และ Bushway, 1986) (ภาคผนวก ค.1)

3.3.2.2.2 วัดปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด (total dietary fiber) (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ค.2)

3.3.2.2.3 วัดค่าความหนืด โดย Brookfield viscometer หัวเข็มเบอร์ 52

3.3.2.2.4 วัดค่าสี (L a และ b) โดยเครื่องวัดสี

3.3.2.2.5 วัด % syneresis โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน (Maltschev และ Mollov, 1996) (ภาคผนวก ค.3)

3.3.2.2.6 ทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความข้นหนืด และความชอบรวม ด้วยแบบทดสอบเชิงพรรณนาชนิด structured scaling ดังแสดงในภาคผนวก ง.1 โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน (semi trained) 20 คน

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 4x2 ทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับข้อ 3.3.2.2.1-3.3.2.2.4 ข้อ 3.3.2.2.5 วางแผนแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 4x2x3 ทดลอง 2 ซ้ำ ส่วนข้อ 3.3.2.2.6 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Disign ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.3.3. ศึกษาการใช้สารให้ความคงตัว ในผลิตภัณฑ์

สารให้ความคงตัวที่นำมาใช้มี 2 ชนิด คือ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) (Satialgine® S20) และ คาราจีแนน (carrageenan) (Satiagum™ BDC20) โดยแปรความเข้มข้นของสารให้ความคงตัวทั้ง 2 ชนิด เป็น 5 ระดับ คือ 0 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 %w/w (ทำการทดลองแยกกันระหว่างสารให้ความคงตัวทั้ง 2 ชนิด)

ขั้นตอนการเติมสารให้ความคงตัวนั้น จะผสมสารให้ความคงตัวลงในน้ำตาลทรายและกรด คนให้กระจายตัว หลังจากนั้นนำไปละลายกับน้ำตามขั้นตอนการเตรียมผลิตภัณฑ์ในข้อ 3.3.2.2

ประเมินผลผลิตภัณฑ์เนคต้าฟักทอง ดังนี้

3.3.3.1 วัดค่าความหนืด โดย Brookfield viscometer หัวเข็มเบอร์ 52

3.3.3.2 วัด % syneresis โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 1 3 และ 5 วัน (Maltschev และ Mollov, 1996) (ภาคผนวก ค.3)

3.3.3.3 ทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้านความข้นหนืด ความคงตัว และความชอบรวม ด้วยแบบทดสอบหาความแตกต่างชนิด scoring test ดังแสดงในภาคผนวก ง.2 โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน (semi trained) 20 คน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ ในข้อ 3.3.3.1 และแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 5x3 ในข้อ 3.2 ส่วนข้อ 3.3.3.3 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.3.4. ศึกษาการปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์

ในขั้นตอนนี้จะศึกษาชนิดกรด ปริมาณกรด และปริมาณน้ำตาลทรายที่ใช้ ดังนี้ แปรชนิดกรดเป็น 2 ชนิด คือ กรดซิตริก และกรดซิตริกผสมกรดมาลิก ในอัตราส่วน 1:1 (โดยน้ำหนัก) ปริมาณกรด 2 ระดับ คือ 0.15 และ 0.20 %w/w ปริมาณน้ำตาลทราย 10 และ 12 % w/w

ประเมินผลผลิตภัณฑ์ โดยใช้ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน รสชาติ กลิ่น และความชอบรวม ด้วยแบบทดสอบความชอบชนิด hedonic scaling ดังภาคผนวก ง.3 โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน (semi trained) 20 คน

วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial in Randomized Complete Block Design ขนาด 2x2x2 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

3.3.5 ศึกษาผลของระยะเวลาเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

นำเนคต้าฟักทองที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 บรรจุในกระป๋องเคลือบแลคเกอร์ ขนาด 202x308 ผนึกฝา และฆ่าเชื้อในหม้อฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 216 °F จนได้ Process value (P) ที่กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (F^{15}_{200}) เท่ากับ 5 (Campden & Chorleywood, Food Research Association, 1993) (วิธีการคำนวณหาระยะเวลาฆ่าเชื้อแสดงดังภาคผนวก ฉ) นำไปทำให้เย็นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ประเมินผลผลิตภัณฑ์ทุกเดือน เป็นเวลา 5 เดือน ดังนี้

3.3.5.1 วัดปริมาณเบต้าแคโรทีน โดย HPLC (Bureau และ Bushway, 1986) (ภาคผนวก ค.1)

3.3.5.2 วัดค่าสี (L a และ b) โดยเครื่องวัดสี

3.3.5.3 ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความคงตัว และความชอบรวม ด้วยแบบทดสอบความชอบชนิด hedonic scaling ดังภาคผนวก ง.4 โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน (semi trained) 20 คน

3.3.5.4 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ ยีสต์และรา (Harrigan และ McCance, 1976) (ภาคผนวก ค.4 และ ค.5)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ ในข้อ 3.3.6.1 และ 3.3.6.2 ส่วนข้อ 3.3.6.3 วางแผนทดลองแบบ Randomized Complete Block Design วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Nissin, 1986) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Cochran และ Cox, 1957)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย