บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

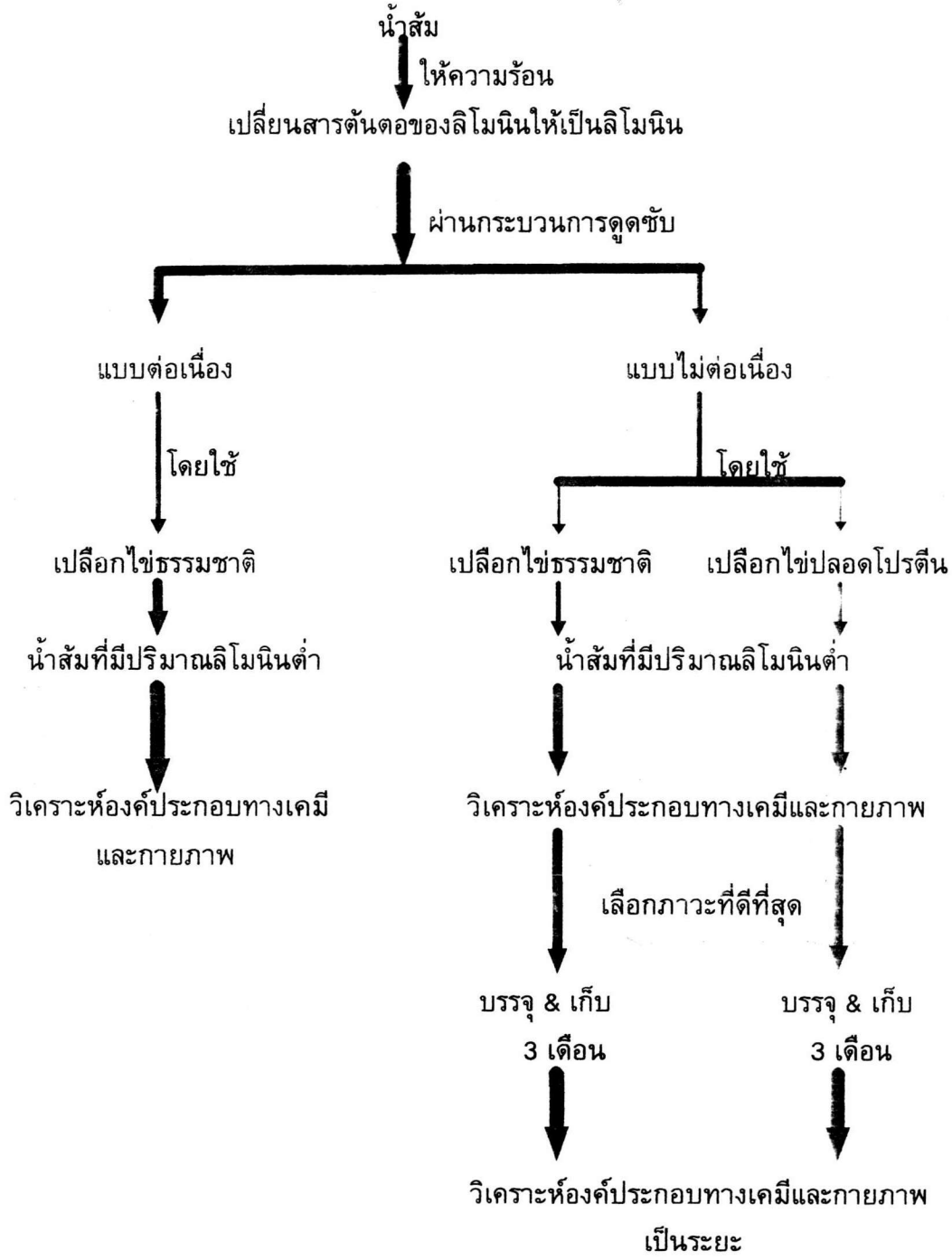
3.1. อุปกรณ์

อุปกรณ์	ตัวแบบ (model)	ประเทศ บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต
เครื่องคั้นน้ำผลไม้ (Hand reamer)	CP-430	-
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	Unicam SP-1800	Pye Unicam, England
เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด	BA 210 S	Sartorius GmbH, Germany
เครื่องเขย่า	Sybron SE rotator/ shaker	Sybron
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	GS 100	Clements
เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)	RE-111	Buchi ,Switzerland
เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์แบบมือถือ (Hand refractometer)	ATAGO	Japan
เครื่องผสมเวอร์เทกซ์ (Vertex mixer)	G-560 E	Scientific industries,USA
เครื่องวัดสี	Minolta chroma meter series CR-300	Minolta
ตู้อบไฟฟ้า	VTS -70	Ehret
เครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อน	Restch Type Vibro	-
เครื่องบดด้วยความเร็วสูง	Ultra-turax T25	Junke&kunsel IKA Labortechnik

อุปกรณ์	ตัวแบบ (model)	ประเทศ บริษัทหรือหน่วยงานผู้ผลิต
หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)	-	-
กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope)	JSM T220 A	JEOL
เครื่องเคลือบทองไฟน์โคต	Ion sputter model JEC-1100	JEOL
เครื่องวัด pH	PHM 64	Radiometer, Copenhagen
เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)	LC-3A	Shimadsu, Japan
เครื่อง Detector	LDC-4100	Shimadsu, Japan
อุปกรณ์แพคเบดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน. 1 ซม. สูง 30 ซม.	-	ประกอบขึ้นเองตามคำอธิบายในข้อ 2.2.3
เครื่องสูบ (Peristaltic pump)	-	Gilson
เครื่อง Retort	-	สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2. วิธีดำเนินการวิจัย

มีขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนการทดลองโดยรวม

3.2.1 การเตรียมน้ำส้มและการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำส้ม

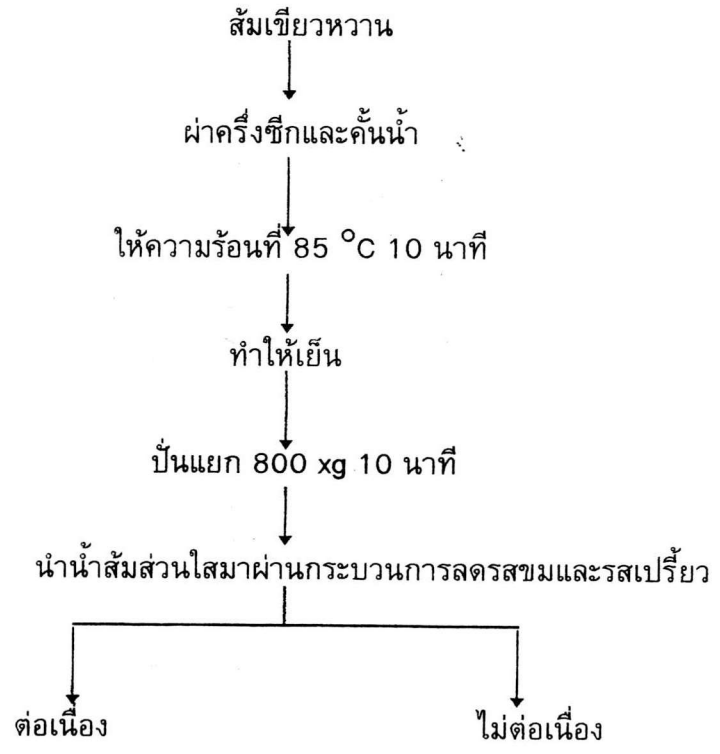
3.2.1.1 การเตรียมน้ำส้ม

3.2.1.1.1 การเตรียมผลส้ม คัดเลือกผลส้มเขียวหวานพันธุ์ผิวเรียบ (จากตลาดไท อายุประมาณ 35-40 สัปดาห์) ที่สด และสะอาด ไม่มีตำหนิหรือรอยฟกช้ำบริเวณผิว ล้างผลส้มให้สะอาดโดยวิธีแช่น้ำและล้างด้วยมือ

3.2.1.1.2 การคั้นน้ำส้ม ผลส้มหลังจากทำความสะอาดแล้ว นำมาผ่าครึ่งซีก และคั้นทีละซีกด้วยเครื่องคั้นน้ำ จะคั้นทั้งหมด 3 ครั้งต่อผลส้ม 1 ซีก

3.2.1.1.3 การให้ความร้อนและการปั่นแยก หลังจากได้น้ำส้มคั้นแล้วนำมาให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเปลี่ยนสารต้นตอของลิโมนินให้เป็นลิโมนิน ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 xg เป็นเวลา 10 นาที

3.2.1.1.4 เก็บตัวอย่างน้ำส้มส่วนใสไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ นำน้ำส้มส่วนใสทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในกระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยว ขั้นตอนการเตรียมน้ำส้มแสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การเตรียมน้ำส้ม

3.2.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำส้ม (รายละเอียดบางส่วนอธิบายไว้ในภาคผนวก ก)

นำน้ำส้มส่วนใสมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพดังนี้

3.2.1.2.1 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid) เป็นองศาบริกซ์ โดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (Kimball, 1991)

3.2.1.2.2 วิเคราะห์ปริมาณกรด (Acidity) คำนวณเป็นเปอร์เซนต์ โดยการไทเทรต (Kimball, 1991)

3.2.1.2.3 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid) โดยการไทเทรต ตามวิธี AOAC (1990)

3.2.1.2.4 วิเคราะห์ปริมาณนารินจิน โดยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Davis, 1947)

3.2.1.2.5 วิเคราะห์ปริมาณลิโมนิน โดย HPLC (Rouseff and Fisher, 1980)

3.2.1.2.6 ค่าสี โดยเครื่องวัดสี (Minolta chroma meter series CR-300)

3.2.1.2.7 ปริมาณแคลเซียมและโปตัสเซียม โดยเครื่องการดูดกลืนอะตอม (Atomic absorption)

3.2.2 การเตรียมเปลือกไข่เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับ

ใช้เปลือกไข่ไก่เป็นตัวแทนในการทดลองศึกษามี 2 ลักษณะคือ เปลือกไข่ธรรมชาติ และเปลือกไข่ปลอดโปรตีน โดยมีวิธีเตรียมดังนี้

3.2.2.1 การเตรียมเปลือกไข่ธรรมชาติ

3.2.2.1.1 ล้างเปลือกไข่ด้วยน้ำและผงซักฟอก เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่เกาะเปลือกไข่ ล้างด้วยน้ำหลายครั้งจนผงซักฟอกหมด และลอกเยื่อเปลือกไข่

3.2.2.1.2 นำเปลือกไข่ที่ล้างสะอาดและลอกเยื่อเปลือกไข่ ผึ่งบนตะแกรง เพื่อให้สะเด็ดน้ำ

3.2.2.1.3 นำเปลือกไข่ไปทำให้แห้ง ด้วยการอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 $\pm$ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็น

3.2.2.1.4 บดลดขนาดเปลือกไข่ด้วยเครื่องบดความเร็วสูง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.2.2.1.5 เปลือกไข่ที่บดละเอียด นำมาแยกขนาดด้วยเครื่องเขย่าแบบตะแกรงร่อนออกเป็น 3 ขนาด คือ 20-40 เมช 40-60 เมช และ60-80 เมช บรรจุลงขวดเก็บในที่แห้งและเย็น เตรียมไว้สำหรับทดลองต่อไป

3.2.2.1.6 เปลือกไข่บางส่วนนำมาเคลือบทองด้วยเครื่องไฟน์โคต (fine coat)นาน 5 นาที ดูโครงสร้างเปลือกไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบสแกน

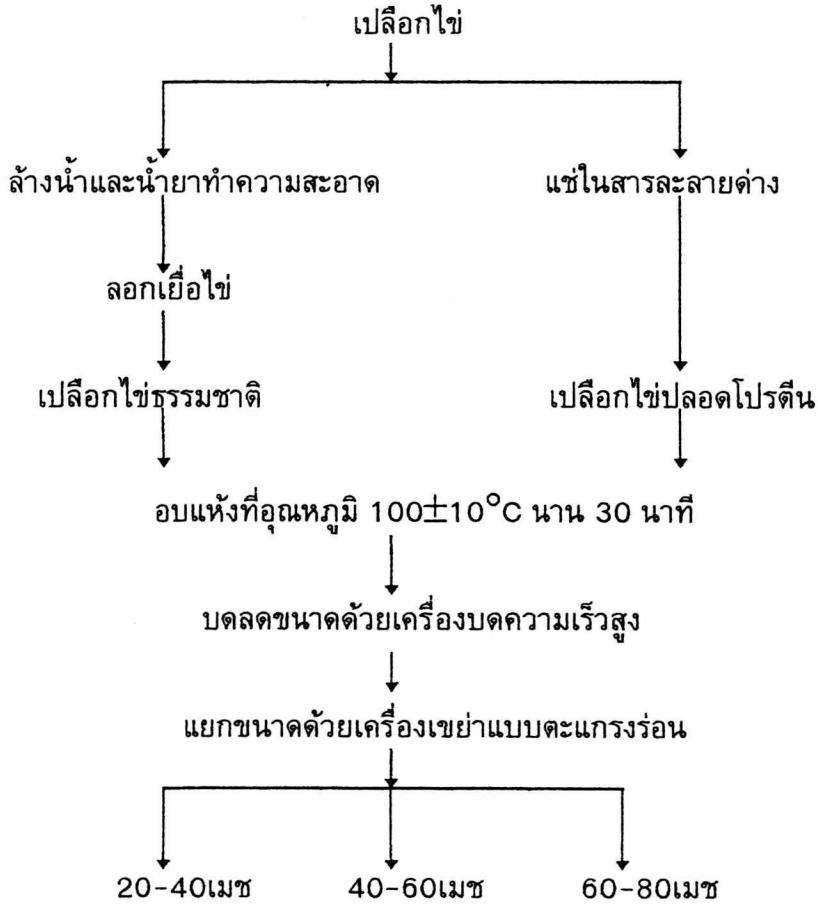
ขั้นตอนการเตรียมเปลือกไข่ธรรมชาติ แสดงในรูปที่ 5

3.2.2.2 การเตรียมเปลือกไข่ปลอดโปรตีน

3.2.2.2.1 ล้างเปลือกไข่ด้วยน้ำและนำไปแช่ในสารละลายโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 5 วัน เพื่อทำลายสารประกอบพวกโปรตีน ในเปลือกไข่ ตามวิธีที่อธิบายโดย Kaplan และ Siegesmund (1973)

จากนั้นดำเนินการในทำนองเดียวกับข้อ 3.2.2.1.2-2.2.1.6

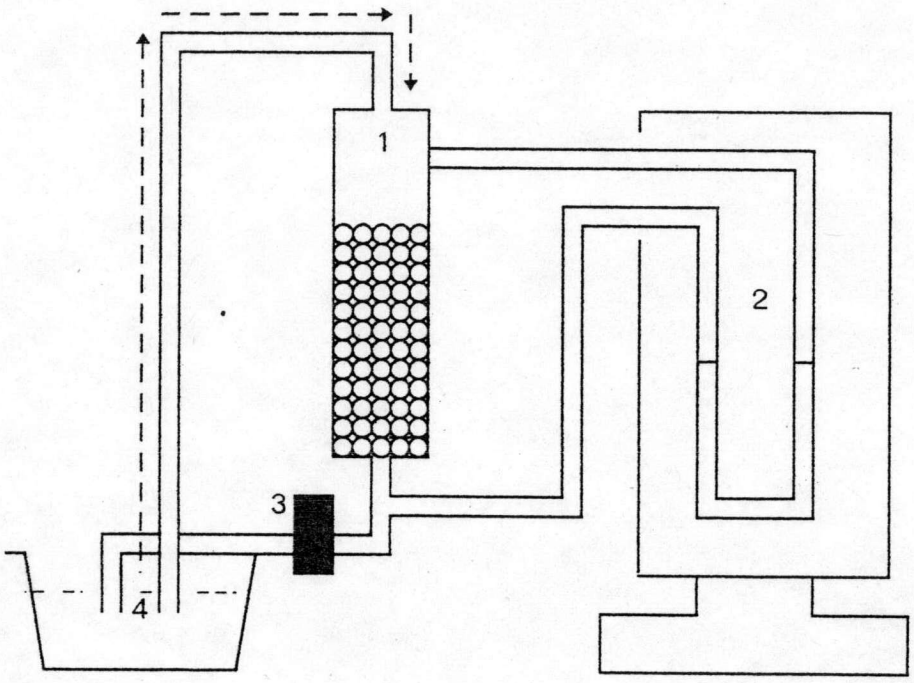
ขั้นตอนการเตรียมเปลือกไข่ปลอดโปรตีน แสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเตรียมเปลือกไข่ปลอดโปรตีน และเปลือกไข่ธรรมชาติ

3.2.2.3 การเตรียมคอลัมน์แบบบรรจุแน่นด้วยเปลือกไข่ (egg shell pack-bed column)

ใช้คอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 เซนติเมตร ความสูง 30 เซนติเมตร ที่ปลายมี sintered glass ป้องกันเปลือกไข่หลุดปะปนกับน้ำส้ม การเตรียมคอลัมน์ต้องเทน้ำกลั่นลงไปก่อนให้มีปริมาตรเกือบเต็มคอลัมน์ ค่อยๆใส่เปลือกไข่ทีละน้อยจนครบจำนวน 100 กรัม ปล่อยน้ำกลั่นให้ไหลผ่านคอลัมน์ออกไปช้าๆ จนกระทั่งเหลืออยู่เหนือคอลัมน์ประมาณ 2-3 มล. จึงปั๊มน้ำส้มผ่านคอลัมน์ (ระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง เพราะจะมีอากาศผ่านเข้าไปในคอลัมน์) อุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ร่วมกับคอลัมน์ ได้แก่ มานอมิเตอร์ เครื่องสูบ (peristaltic pump) และถังก๊าซไนโตรเจน



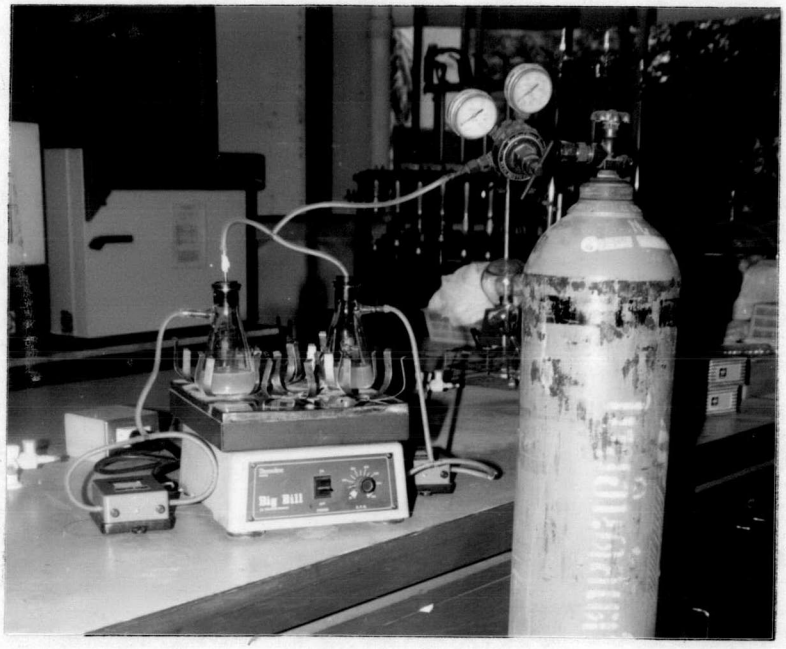
1 คือ คอลัมน์

2 คือ มานอมิเตอร์

3 คือ peristaltic pump

4 คือ น้ำส้ม

รูปที่ 6 แผนผังกระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยวอย่างต่อเนื่องและอุปกรณ์อื่น ๆ



รูปที่ 7 กระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยวในน้ำส้มอย่างไม่ต่อเนื่อง

3.2.3.หาภาวะที่เหมาะสมในการลดรสขมและรสเปรี้ยวในน้ำส้มเขียวหวานอย่างต่อเนื่อง ด้วยคอลัมน์แบบบรรจุแน่นด้วยเปลือกไข่ธรรมชาติ (egg shell pack - bed column)

น้ำส้มที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.2.1.1 นำมาผ่านกระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยวอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ peristaltic pump เป็นตัวปั๊มน้ำส้มผ่านคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 ซม. และสูง 30 ซม. ในคอลัมน์บรรจุเปลือกไข่ 100 กรัม ซึ่งมีปริมาตรเบดเปลือกไข่เท่ากับ 40 มล. ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน ดังรูปที่ 6 โดยพิจารณาตัวแปรดังนี้

ก. Space velocity หมายถึงสัดส่วนระหว่างความเร็วการไหลต่อปริมาตรของเบด (Bed volume, BV) เปลือกไข่ในคอลัมน์ 3 ระดับ คือ 2, 4 และ6 นาที$^{-1}$

ข. ขนาดอนุภาคของเปลือกไข่ 3 ระดับคือ 20-40 เมช, 40-60 เมช และ60-80 เมช

เก็บตัวอย่างน้ำส้ม 5 ส่วน (fraction) แต่ละส่วนที่เก็บให้มีการไหลเวียนของน้ำส้มต่างกัน 2 ปริมาตรเบด ซึ่งปริมาตรของเบดแรกทิ้งไป เพราะมีน้ำทำให้เจือจางตัวอย่างน้ำส้มทั้ง 5 ส่วน ของแต่ละ Treatment combination นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำส้มตามข้อ 3.2.1.2 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์เชิงสถิติแบบ Symmetrical factorial ขนาด 3×3 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's New Multiple Range Test

3.2.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการลดรสขมและรสเปรี้ยวในน้ำส้มเขียวหวานอย่างไม่ต่อเนื่อง (Batch process) ด้วยเปลือกไข่ธรรมชาติและเปลือกไข่ปลอดโปรตีน

3.2.4.1 หาภาวะที่เหมาะสมในการลดรสขมและรสเปรี้ยวในน้ำส้มเขียวหวานอย่างไม่ต่อเนื่อง ด้วยเปลือกไข่ธรรมชาติ

น้ำส้มที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.2.1.1 นำมาผ่านกระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยวอย่างไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าน้ำส้มพร้อมเปลือกไข่ธรรมชาติด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ดังรูปที่ 7 โดยพิจารณาตัวแปรดังนี้

I20503088

ก. ขนาดของเปลือกไข่คือ 20-40 เมช, 40-60 เมช และ 60-80เมช

ข. ปริมาณเปลือกไข่ต่อน้ำส้มเขียวหวานเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร 3 ระดับ คือ 5, 10 และ 15

ค. เวลาในการเขย่า คือ 10, 30 และ60 นาที

เมื่อครบเวลานำเปลือกไข่ออกจากขวดแก้วทันที โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เก็บน้ำส้มตัวอย่าง เพื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำส้มตามข้อ 3.2.1.2 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์เชิงสถิติแบบ Symmetrical Factorial ขนาด 3×3×3 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

3.2.4.2 ประเมินภาวะที่เหมาะสมในการลดรสขมและรสเปรี้ยวในน้ำส้มเขียวหวานอย่างไม่ต่อเนื่องด้วยเปลือกไข่ปลอดโปรตีน

น้ำส้มที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.2.1.1 นำมาผ่านกระบวนการลดรสขมและรสเปรี้ยวอย่างไม่ต่อเนื่องในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าน้ำส้มพร้อมเปลือกไข่ปลอดโปรตีนด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน โดยพิจารณาตัวแปรดังนี้

ก. ขนาดของเปลือกไข่คือ 20-40 เมช, 40-60 เมช และ60-80 เมช

ข. ปริมาณเปลือกไข่ต่อน้ำส้มเขียวหวานเป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร 2 ระดับ คือ 10 และ15

ค. เวลาในการเขย่า คือ 30 และ60 นาที

เมื่อครบเวลานำเปลือกไข่ออกจากขวดแก้วทันที โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เก็บน้ำส้มตัวอย่าง เพื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำส้มตามข้อ 3.2.1.2 นำผลการทดลองมาวิเคราะห์เชิงสถิติแบบ Asymmetrical Factorial ขนาด 3×2×2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย

3.2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลิโมนินและความขมในน้ำส้มโดยวิธีทดสอบทางประสาทสัมผัส

วิเคราะห์ระดับความขมของน้ำส้มคั้นที่มีความเข้มข้นของปริมาณลิโมนิน 5.63, 7.29, 8.34, 9.78, 10.89, และ11.09 ส่วนในล้านส่วน เปรียบเทียบกับสารละลายลิโมนินในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ10 ส่วนในล้านส่วน เพื่อนำไปใช้เป็นมาตรฐานระดับรสขมที่ผู้บริโภคสามารถตรวจสอบได้ ใช้วิธีให้คะแนนตามวิธี Scoring test โดยให้สเกลดังนี้

1 คะแนน =ไม่ขมเลย 2 คะแนน = ขมเล็กน้อย 3 คะแนน = ขมปานกลาง
4 คะแนน = ขมมาก 5 คะแนน = ขมมากที่สุด

พร้อมกับทำการจัดลำดับ (Ranking Test) ตามวิธีของ Fisher และ Yates (1942) เพื่อหาความเกี่ยวโยงและความแม่นยำในการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณลิโมนินต่างกัน ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 6 คน ทดสอบ 2 ซ้ำ วางแผนแบบสุ่มตลอดในบล็อก (Randomized complete block design) วิเคราะห์วาเรียนซ์ (variance) โดยใช้ F-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Least significance difference (LSD)

3.2.6 วิเคราะห์อายุการเก็บของน้ำส้มที่ผ่านขั้นตอนการลดรสขมอย่างไม่ต่อเนื่องเปรียบเทียบกับน้ำส้มที่ไม่ผ่านการลดรสขม

ผลิตน้ำส้มตามกระบวนการลดรสขมอย่างไม่ต่อเนื่อง ในบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน ใช้เปลือกไข่ทั้ง 2 ลักษณะ เลือกภาวะที่สามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดจากข้อ 3.2.4.1 และ 3.2.4.2 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับน้ำส้มที่ไม่ผ่านกระบวนการลดรสขม นำมาบรรจุกระป๋องขนาดเบอร์ 202 หรือขนาดบรรจุ 160 มล. พาสเจอไรซ์ ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ก.) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้เวลาศึกษาประมาณ 3 เดือน หรือจนกว่าผลิตภัณฑ์จะเสื่อมคุณภาพจนผู้ทดสอบรู้สึกได้ชัดเจน สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพตามข้อ 3.2.1.2 เก็บเป็นระยะ กล่าวคือ ในเดือนแรกเก็บทุกสัปดาห์ เดือนที่สองเก็บทุก 2 สัปดาห์ และ เดือนที่สามเก็บสัปดาห์สุดท้าย โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในบล็อก (Randomized complete block design) ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่แสดงคุณภาพผลิตภัณฑ์โดย Duncan's New Multiple Range Test (Snedecor and Cochran, 1967)