บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

ตะไคร้แกง (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf.) จากจังหวัดปทุมธานี

น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล (บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด)

กรดซิตริก (food grade) (ห้างหุ้นส่วน นิวทรีชั่น จำกัด)

กรดฟอสฟอริก (food grade) (Merck)

กรดมาลิก (food grade) (ห้างหุ้นส่วน นิวทรีชั่น จำกัด)

กลูโคโนเดลต้าแลคโตน (food grade) (ห้างหุ้นส่วน นิวทรีชั่น จำกัด)

ไข่ไก่

สารเคมี

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

n-pentane (purity 99%), GC grade (Carlo Erba)

Citral (purity 97%), GC. grade (Fluka)

Ethyl alcohol, A.R. grade (Carlo Erba)

Di-sodiumhydrogenphosphate, A.R. grade (Fluka)

Sodium-di-hydrogenphosphate, A.R. grade (Fluka)

กระดาษกรอง Whatman No.1 เส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร (Whatman)

Laboratory sealing film (Whatman)

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

Sodium chloride, A.R. grade (Univar)

Standard Method Agar (Becton Dickinson)

Nutrient broth (Difco)

Beef extract (Difco)

peptone (Difco)

D-mannitol

Agar powder (Difco)

phenol red

paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (Toyo Seisakusho, Japan)

อุปกรณ์

การผลิตและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

Waring blender (blender 8010, model 32BL79)

เทอร์โมมิเตอร์ 0-100^{o}C

ขวดแก้วขนาด 300 มิลลิลิตร พร้อมฝาพลาสติกที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร

ถุงผ้าขาวบาง ชนิดตาละเอียด

หม้อ stainless steel ขนาดใหญ่และกลางพร้อมฝา

ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4-10^{o}C

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, WTB Binder W-Germany, B53)

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ชนิด Top loading (Satorius, model 1907)

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ((Satorius, model A200S)

pH meter (Hanna Instruments, Model 8417)

เครื่องแก้วสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง บิเปต เป็นต้น

การวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่อง Gas Chromatography

Gas Chromatography (Shimadzu, model 7AG) ซึ่งมีรายละเอียดของเครื่องและภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

- packed column

  supporting solid : SW 60-80 mesh

  stationary phase : Carbowax 20 M (polyethylene glycol)

  column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ID) 3 มิลลิเมตร ความยาว 2 เมตร

- FID detector
- recorder รุ่น C-RIA ของ Shimadzu
- ภาวะในการวิเคราะห์

  injection temperature 250 องศาเซลเซียส

  temperature programming

  เริ่มที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส คงที่ 4 นาที แล้วเพิ่มในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 180 องศาเซลเซียส

  mobile gas phase : N_2 40 มิลลิลิตรต่อนาที

Rotary evaporator (Heidolph, VV 2000)

หลอดแก้วทดลองขนาดเล็กพร้อมฝาเกลียว

การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

Hand refactrometer (Atago N1, 0-32 ^{o}Brix)

Spectrophotometer (Milton Roy, Spectonic 601)

เครื่องวัดสี Lovibond (The Tintometer Limited England, Model flexible optic tintometer AF751)

Moisture Analyzer (Sartorius, model MA30)

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

Autoclave (Sanyo, MLS-2400)

Incubator อุณหภูมิ 25-70°C (Memmert, B30)

Micropipette ขนาด 40-200 μl และ ขนาด 1000 μl

Water bath (MGW LAUDA, MS12)

Shaker (New Brunswick Scientific)

แท่งแก้วงอ

หลอดแก้วทดลองขนาดกลางพร้อมฝาเกลียว

petri dish

เชื้อจุลินทรีย์

สำหรับใช้ทดสอบในการศึกษาประสิทธิภาพของสาร citral น้ำตะไคร้คั้น และสารสกัดจากตะไคร้ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ Staphylococcus aureus TISTR 118, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa และ Micrococcus luteus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16097911

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของตะไคร้

1.1 ปริมาณความชื้น ด้วยเครื่อง Moisture analyzer ของ Satorius รุ่น A-200s โดยนำตัวอย่างตะไคร้มาปั่นในเครื่อง Waring blender ให้ละเอียด

1.2 นำตัวอย่างน้ำตะไคร้ที่เตรียมได้จากการปั่นตะไคร้กับน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 มาวัดค่า pH ด้วย pH meter และวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วย Hand refracto-meter

1.3 วิเคราะห์หาปริมาณ citral โดยใช้ Gas chromatographic method โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Hall (1973) รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.4

2. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำตะไคร้ต้น สารสกัดจากตะไคร้ และสาร citral ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.1 ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จาก สารcitral

2.1.1 เตรียมสารละลาย citral โดยละลายสาร citral ใน n-pentane ให้มีความเข้มข้นของ citral เป็น 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทำการทดสอบในข้อ 2.1.3

2.1.2 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ S. aureus, B. subtilis และ E. coli มาทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ (preculture) โดยนำเชื้อจุลินทรีย์

ที่จะนำมาทดสอบ เช่น Staphylococcus aureus TISTR 118 ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar slant ที่ผ่านการถ่ายเชื้อ (subculture) มาแล้วไม่เกิน 48 ชั่วโมง นำมา 1 ลูปเต็ม (loopful) โดย inoculate เชื้อนี้ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ Nutreint broth (NB) 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำมาเขย่าบน shaker โดยปรับความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง โดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (OD) เป็น 0.6-0.7 จึงหยุดเขย่า แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมได้ไปใช้ทดสอบขั้นต่อไป

2.1.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Morris, Khenttry และ Seitz (1979)

ปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีการตามข้อ 2.1.2 มาเจือละ 1.0 มิลลิลิตร มีจำนวนเชื้อ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Standard Method Agar (ที่เตรียมโดยวิธีการตามภาคผนวก ข) ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยควบคุมให้อาหารเลี้ยงเชื้อนี้มีอุณหภูมิประมาณ 42-45 องศาเซลเซียส ขณะทำการ inoculate เชื้อจุลินทรีย์ลงไปเขย่าให้เข้ากัน นำมาเทใส่ใน plate ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ต่อ plate ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำ paper disc ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อมาหยดสารที่จะทดสอบ (test solutions) ได้แก่ สาร citral ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 $\pm$1 ได้แก่ น้ำลำต้นตะไคร้ต้น (L) สารสกัดจากลำต้นตะไคร้ (E) และ n-pentane (C) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการวัด (control) แล้ว นำมาวาง 1 disc ต่อ plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone (มิลลิเมตร)

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำตะไคร้คั้นและสารสกัดจากตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

2.2.1 การเตรียมน้ำตะไคร้คั้นและสารสกัดจากตะไคร้

2.2.1.1 การเตรียมน้ำตะไคร้คั้น

นำต้นตะไคร้สด มาลอกกาบส่วนและใบที่เสียทิ้ง แล้วล้างทำความสะอาด นำมาแช่ในสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตความเข้มข้นร้อยละ 5 ประมาณ 10-15 นาที ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ โดยแยกส่วนระหว่างลำต้นและใบตะไคร้ จากนั้นนำตะไคร้ส่วนลำต้นมาชั่งน้ำหนัก 50 กรัม นำมาตีปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 มิลลิลิตรใน Waring blender ใช้ความเร็วสูงสุดในการตีปั่นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว) เพื่อแยกน้ำและเนื้อตะไคร้ออกจากกัน แล้วนำน้ำตะไคร้ที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว) อีกครั้ง ได้น้ำตะไคร้ใสสีน้ำตาลบรรจุในหลอดทดลองขนาดบรรจุ 50 มิลลิลิตร มีฝาเกลียวปิด แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

2.2.1.2 การเตรียมสารสกัดจากตะไคร้

นำตะไคร้สดมาเตรียมน้ำตะไคร้เช่นเดียวกับข้อ 2.1.2.1 แต่ใช้ตะไคร้ส่วนลำต้น 150 กรัมต่อน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร เมื่อได้น้ำตะไคร้ใสสีน้ำตาลแล้ว นำมาสกัดสารจากตะไคร้ด้วยตัวทำละลาย n-pentane โดยน้ำตะไคร้สด 100 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก (separating funnel) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปต n-pentane 50 มิลลิลิตร ใส่ลงไปเขย่าสกัดนาน 10 นาที โดยคอย release gas เป็นระยะๆ แยกชั้นที่อยู่ด้านบนออกมา โดยทิ้งส่วนที่เป็นน้ำตะไคร้ที่สกัดแล้วด้านล่างไป นำ n-pentane ที่แยกมาได้ไประเหย n-pentane ออกภายใต้ความดันสุญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator ตั้งอุณหภูมิของ water bath เท่ากับ 30°C จนมีปริมาตรสุดท้าย 2 มิลลิลิตร นำมาทดสอบความ

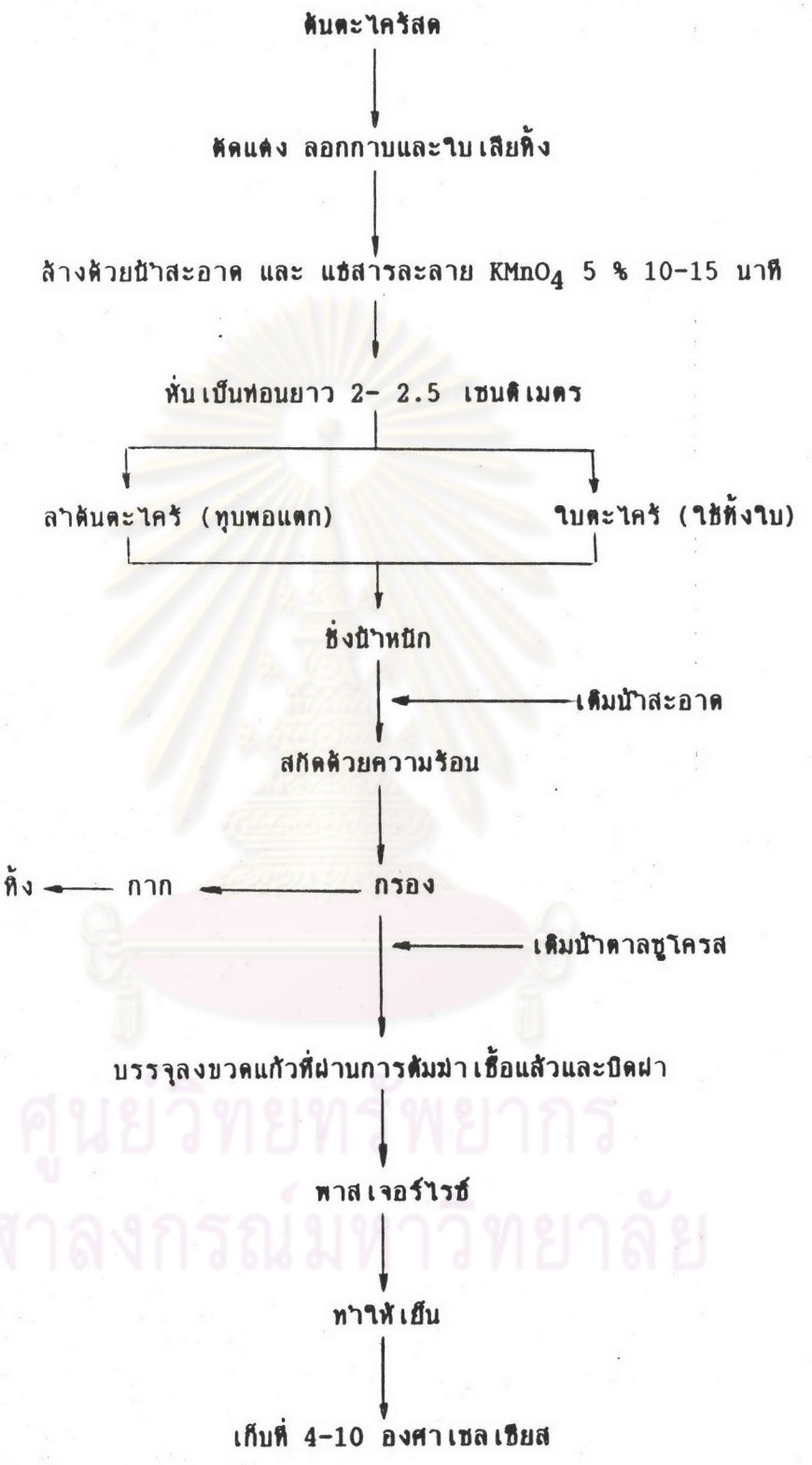
สามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่อไป

2.2.2 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis และ Micrococcus luteus และแบคทีเรียแกรมลบ Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae และ Pseudomonas aeruginosa มาทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ (preculture) ตามวิธีในข้อ 2.1.2

2.2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากข้อ 2.2.2 ทำเช่นเดียวกับของ 2.1.3

3. ศึกษาสูตรและกระบวนการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

นำต้นตะไคร้สดมาตัดแต่งลอกกาบและใบเสียทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปแช่สารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตเข้มข้นร้อยละ 5 นาน 10-15 นาที แล้วทิ้งให้สะเด็ดน้ำ นำมาหั่นเป็นท่อนยาวประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร โดยแยกเป็นส่วนลำต้นและใบ โดยส่วนลำต้นจะทุบให้พอแตก เพื่อเวลาทำการสกัดด้วยความร้อนจะสกัดได้ดีขึ้น หลังจากนั้นนำตะไคร้ที่เตรียมได้ มาชั่งน้ำหนักตามอัตราส่วนที่ใช้ศึกษา ลำต้น:ใบตะไคร้ (20:20, 40:20, 60:20, 80:20 และ 100:20) ต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วทำการสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ (75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส) และเวลา (3, 5 และ 10 นาที) จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น เพื่อแยกกากทิ้งไป ส่วนน้ำตะไคร้ที่สกัดได้จะนำมาปรับรสชาติด้วยการเติมน้ำตาลซูโครส (ร้อยละ 8, 10, 12 และ 14 น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยบรรจุลงขวดแก้วขนาด 400 มิลลิลิตร ปริมาตร 380 มิลลิลิตร มี headspace ประมาณ 4 เซนติเมตร ที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้วและปิดฝา นำมาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ (65, 70, 75 และ 80) และเวลา (3, 5 และ 10 นาที) แล้วทำให้เย็นหลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ดังแสดงกระบวนการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ ในรูปที่ 4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 กระบวนการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

3.1 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของตะไคร้ ในการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ โดยแปรสัดส่วนของตะไคร้(ลำต้น:ใบ)กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เป็น 5 สูตร ดังนี้

สูตร	อัตราส่วนตะไคร้ (ลำต้น:ใบ)	ปริมาณตะไคร้ (กรัม)ต่อ น้ำ 1 ลิตร	
		ลำต้น	ใบ
1	1:1	20	20
2	2:1	40	20
3	3:1	60	20
4	4:1	80	20
5	5:1	100	20

นำแต่ละสูตรมาผ่านขั้นตอนในการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยสกัดน้ำตะไคร้ที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาปรับรสชาติด้วยการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 w/v แล้วนำมาประเมินคุณภาพเพื่อคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุด โดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

3.1.1 ทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยพิจารณาด้าน สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะปรากฏ และการยอมรับรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ 9 point Hedonic scale test ให้ระดับคะแนน 9 หมายถึงชอบที่สุด 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด และ 5 หมายถึง เฉยๆ ถ้าผู้ทดสอบ ให้คะแนนที่ระดับ 5 คะแนนขึ้นไปถือว่าผู้ทดสอบยอมรับผลิตภัณฑ์ (รายละเอียดแบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ค) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535) ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 16 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง

2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT (Freed, 1986) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (จรัญ จันทลักขณา, 2527)

3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) ด้วยเครื่อง hand refractometer วัดค่า pH ด้วย pH meter และ ปริมาณ citral เช่นเดียวกับข้อ 1.3 ในผลิตภัณฑ์ทุกสูตร

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.2 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตะไคร้

จากอัตราส่วนของลำต้นต่อใบตะไคร้ที่เลือกได้จากข้อ 3.1 นำมาศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตะไคร้ โดยแปรอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส และแปรเวลาเป็น 3 ระดับ คือ 3, 5 และ 10 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาปรับรสชาติด้วยการเติมน้ำตาลซูโครสให้ปริมาณน้ำตาลเป็นร้อยละ 10 w/v แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

3.2.1 ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะปรากฏ และการยอมรับรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ 9 point Hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 14 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Factorial Randomized Complete Block Design ขนาด 3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด ค่า pH และ ปริมาณ citral เช่นเดียวกับข้อ 3.1.2 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.3 ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม

จากตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ที่เลือกจากข้อ 3.2 นำมาศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ต้องเติมเพื่อปรับรสชาติความหวานของเครื่องดื่ม โดยแปรปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็นร้อยละ 8, 10, 12 และ 14 w/v นำตัวอย่างที่เตรียมตามกระบวนการผลิตในรูปที่ 4 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ โดยทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน รสชาติ สี และการยอมรับรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ 9 point Hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 14 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.4 ศึกษาชนิดของสารที่เหมาะสมในการปรับ pH ของผลิตภัณฑ์

ศึกษาชนิดของสารที่เหมาะสมในการปรับ pH ของผลิตภัณฑ์โดยแปรสาร 4 ชนิด คือ citric acid, malic acid, phosphoric acid และ glucono delta lactone (GDL) ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในอาหารและเครื่องดื่ม (Arnold, 1975) โดยจากการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาระดับ pH ต่ำที่สุดของสารแต่ละชนิดที่ไม่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์ พบว่าที่ pH 4.4 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมกับสารทุกสุด เตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ที่เลือกได้จากข้อ 3.1-3.3 นำมาปรับให้เป็น pH 4.4 ด้วยสาร 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้น เก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้าน

รสชาติ สี และการยอมรับรวม โดยใช้ 9 point Hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 16 คน วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เช่นเดียวกับข้อ 3.3 และทำการเปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ปรับ pH กับไม่ปรับ pH นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.3 มาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติ สี ความชอบโดยรวมเพื่อหาความชอบระหว่างผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 แบบ โดยใช้การทดสอบ และวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design เช่นเดียวกับข้อ 3.3

3.5 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรซ์ เครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

เตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้โดยใช้ภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3.1-3.4 แปรอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์เป็น 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส และแปรเวลาเป็น 3, 5 และ 10 นาที แล้วเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาประเมินคุณภาพ โดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

3.5.1 ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รสชาติ ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวม ใช้ 9 point Hedonic Scale Test วางแผนการทดลองแบบ Balanced Incomplete Block Design (BIB) โดยที่ จำนวนคน (t) = 13 จำนวนซ้ำ (r) = 4 หน่วยการทดลองต่อบล็อก (k) = 4 จำนวนบล็อก (b) = 13 จำนวนครั้งที่สิ่งทดลองแต่ละคู่ปรากฏร่วมกันในบล็อก (λ) = 1 ใช้ผู้ทดสอบแบบ semi-trained จำนวน 13 คน โดยผู้ทดสอบแต่ละคนจะทดสอบ 4 ตัวอย่าง (สุรพล อุปดิสสกุล, 2526) (รายละเอียดแบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ง.5) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT

3.5.2 วัดสีด้วยเครื่อง Lovibond (ภาคผนวก ก.1)

3.5.3 วัด browning index (Ranganna, 1976)

3.5.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Harrigan and McCance,1976)

3.5.5 วัดค่าpH

3.5.6 วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

3.5.7 วิเคราะห์ปริมาณ citral เช่นเดียวกับข้อ 1.3

3.5.5-3.5.7 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 4x3 ทดลอง 2 ซ้ำ ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.6. ศึกษาประสิทธิภาพของอุณหภูมิและเวลาในการพาสเจอร์ไรซ์ต่อการทำลาย S. aureus ในเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

3.6.1 นำเชื้อ S. aureus TISTR 118 ซึ่งใช้เป็นจุลินทรีย์ที่จะติดตามผลการอยู่รอดจากภาวะการพาสเจอร์ไรซ์ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการผลิต และเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องตรวจวิเคราะห์สำหรับอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ ตาม มอก.335 (2523) โดยเตรียม preculture (ตามวิธีในข้อ 2.1.2) และนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6.1 โดยวิธี spread plate โดยตรวจนับที่ระดับความเจือจาง 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.2 เตรียมน้ำตะไคร้ ตามอัตราส่วนที่เลือกได้จากข้อ 3.1 และใช้อุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่เลือกได้จากข้อ 3.2 นำมาปิเปตใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียวหลอดละ 9 มิลลิลิตร และเตรียม phosphate buffer (ตามภาคผนวก ก.5) ปรับpHให้เท่ากับ pH ของน้ำตะไคร้ที่นำมาทดสอบคือ pH 6.4 บรรจุในหลอดทดสอบชนิดฝาเกลียวหลอดละ 9 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม

3.6.3 ปิเปตเชื้อ S. aureus ใส่หลอดทดสอบที่มี phosphate buffer และน้ำตะไคร้ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร แช่หลอดทดสอบใน water bath ตามอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์คือ 65, 70, 75 และ 80 องศา

เซลเซียส โดยให้ระดับน้ำใน water bath อยู่เหนือระดับของหลอดทดสอบ และใช้หลอดน้ำตะไคร้หนึ่งหลอดเป็นหลอดควบคุมอุณหภูมิ โดยเสียบเทอร์โมมิเตอร์ไว้ในหลอดนี้ และเริ่มจับเวลาในการให้ความร้อนเมื่ออุณหภูมิในหลอดควบคุมขึ้นถึงระดับที่ต้องการ นำหลอดทดสอบออกจาก water bath ตามระยะเวลาที่กำหนด คือ 3, 5 และ 10 นาที ในแต่ละอุณหภูมิที่ทดสอบแล้วแช่หลอดทดสอบในน้ำเย็นจัดทันที แล้วนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังคงเหลืออยู่ในแต่ละหลอดด้วยวิธี spread plate ซึ่งใช้ระดับความเจือจางต่างกันตามระยะเวลาที่ให้ความร้อน คือที่ 3 นาที ใช้ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ที่ 5 นาที ใช้ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} และที่ 10 นาที ใช้ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งจะมีอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ที่สั้น จึงต้องใช้การเก็บที่อุณหภูมิต่ำ หรือการเติมสารกันเสีย เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ให้เก็บได้นานขึ้น แต่เนื่องจากผลิตภัณฑ์เป็นเครื่องดื่มสมุนไพร ซึ่งเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงไม่ใช้การเติมสารกันเสียเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บ แต่ใช้วิธีการเก็บที่อุณหภูมิต่ำเป็นการช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ โดยเตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ ใช้สูตรและกระบวนการผลิตที่สรุปได้จากข้อ 3 ที่บรรจุในขวดแก้วขนาด 400 มิลลิลิตร นำมาศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ4-10 องศาเซลเซียส ระหว่างการเก็บจะติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน โดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

4.1 ทดสอบทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

4.2 วิเคราะห์คุณภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2-3.5.6

4.3 วิเคราะห์ปริมาณ citral เช่นเดียวกับข้อ 1.3 และคำนวณค่าเป็น citral retention (%)(ตามภาคผนวก ก.4) ข้อ 4.2-4.3 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MSTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

5. คำนวณต้นทุนราคาของเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้

การคำนวณต้นทุนราคาของเครื่องดื่มสมุนไพรจากตะไคร้ โดยคิดเฉพาะราคาวัตถุดิบ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิจารณาต้นทุนในการผลิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย