บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 แบบการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่องการใช้ประโยชน์จากซังข้าวโพดหวานสีม่วงในการพัฒนาเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มโดยการเอนแคปซูเลชันด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้การสำรวจจากแบบทดสอบผู้บริโภค

3.2 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ศึกษาข้อมูลเชิงปริมาณด้านผลของการการเอนแคปซูเลชันแอนโทไซยานินจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และทดสอบคุณภาพของน้ำที่สกัดได้จากซังข้าวโพดหวานสีม่วง ผงซังข้าวโพดหวานสีม่วง เครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง (ผลิตภัณฑ์สุดท้าย) ด้วยการวิเคราะห์ค่าทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา โดยใช้ผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ

2. ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) โดยทดสอบด้านความชอบของผู้บริโภคโดยใช้แบบสอบถามเพื่อสำรวจความชอบของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดซังข้าวโพดหวานสีม่วง

ส่วนประกอบหลัก

ใช้วัตถุดิบซังข้าวโพดหวานสีม่วง ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่ปรับปรุงขึ้นใหม่จากโครงการธุรกิจข้าวโพดของบริษัทเจียไต๋ จำกัด (เชียงใหม่)

3.3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.3.2.1 เครื่องวัดสี (Color-meter: CR-300, Minolta, Japan)

3.3.2.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (US-Vis Spectrophotometer: Lambda35, Perkinelmer, USA)

3.3.2.3 เครื่องชั่ง (XT320M, Precisa, Switzerland)

3.3.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter: 510, Eutech Instruments, Singapore)

3.3.2.5 เครื่อง Water activity meter (Aqua Lab model series 3, Decagon Device Inc., USA)

3.3.2.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: UM100-UM800, Memmert, Germany)

3.3.2.7 Pocket Refractometer (PAL-α, Atago, Japan)

3.3.2.8 เครื่องปั่น (Blender: HR 2001, Philips, Thailand)

3.3.2.9 Scanning Electron Microscope (Model JEOL JSM-5910LV, JEOL Ltd., Japan)

3.3.2.10 โถดูดความชื้น (desiccators)

3.3.2.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge: EBA 2, Herttich, Germany)

3.3.3 สารเคมี

3.3.3.1 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด (Plate Count Agar, Himedia, India)

3.3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา (Potato Dextrose Agar, Himedia, India) 3.3.3.3 Folin-Ciocalteu Reagent

3.3.3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.3.3.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

3.3.3.6 สารละลาย phenolphthalein 0.1 %

3.3.3.7 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.3.3.8 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

3.3.3.9 โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa)

3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1. การสกัดซังข้าวโพดหวานสีม่วง

ล้างซังข้าวโพดหวานสีม่วงให้สะอาดตัดเป็นท่อน ชั่งน้ำหนัก 250 กรัม ต้มในน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตรที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่า pH โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer

วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่า pH โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

3) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable Acidity; TA) (AOAC, 2000)

วิธีการวิคราะห์

ปิเปตน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลาย phenolphthalein 0.1 % ลงไป 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 normal จนถึงจุดยุติที่ค่า pH = 8.3 โดยใช้เครื่องวัด pH ระหว่างการไทเทรต เนื่องจากสีของน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงทำให้ไม่สามารถ

ดูสีเมื่อถึงจุดยุติได้ จากนั้นวัดปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดดังสมการที่ (1)

$$\% TA = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1 N) * ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (มล.) x 0.064 x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงที่ปิเปต (มล.)}} \quad (1)$$

หมายเหตุ: milliequivalent of citric acid (anhydrous) = 0.064

4) สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (เนตรนภา เมยกลาง และเฉลิม เรืองวิริยะชัย, 2557)

วิธีการวิคราะห์

นำตัวอย่างน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงมาวิเคราะห์ ถ้าสารละลายขุ่นนำไปปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาวิเคราะห์เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต้องการปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีชาขนาดเล็ก เติมสารละลาย 10% (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 7.5% Na_2CO_3 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที (ถ้าสารละลายขุ่นนำไปปั่นเหวี่ยง และนำเอาสารละลายใสมาวิเคราะห์) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (A_{765}) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิกในช่วง 50 – 200 ไมโครกรัม

5) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH diferrential ตามวิธีการของวรพร ศีลศร และคณะ (2555)

วิธีการวิคราะห์

5.1) ทำการสกัดสารละลายเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

5.2) เตรียม pH 1.0 buffer ด้วย 0.025 M KCl และ pH 4.5 buffer ด้วย 0.4 M CH_3COONa และเตรียม Solution extract 500 µl และปรับปริมาตรด้วยบัฟเฟอร์ให้ได้ 1 ml หรือมีอัตราส่วนของ Solution extract : buffer = 5:5

5.3) นำสารละลายที่เตรียมไว้ไปเจย่า และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm และ 700 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน ซึ่งจะแสดงในรูปของ cyanidin-glucoside ดังสมการที่ (2) และ (3)

$$A = (A_{510}\text{-}A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{510}\text{-}A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (2)$$

$$\text{TA content} = (A \times M_w \times \text{dilution factor} \times 100)/(\varepsilon) \quad (3)$$

เมื่อ $M_w = 449.2$ g mol,
$\varepsilon = 26900$ M cm
dilution factor = 1

3. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำที่สกัดได้จากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ค่าสี L* , a* และ b* ด้วยเครื่องมือ Color-meter

วิธีการวัดสี

การใช้เครื่อง Chromameter ปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานก่อนใช้เครื่องทุกครั้ง หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงรินลงในภาชนะใส่ของเหลวแบบแก้ว ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี โดยมีรายละเอียดดังนี้

ค่าสี L* หมายถึง ค่าความสว่าง ซึ่งมีค่า 0 ถึง 100 (ค่า L* มาก แสดงความสว่างมาก, ค่า L* น้อย แสดงความสว่างน้อยหรือมีสีคล้ำ)

ค่าสี a* หมายถึง ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีเขียวและสีแดงที่อยู่ในตัวอย่างสีแดง (ถ้าค่าเป็น +) สีเขียว (ถ้าค่าเป็น -)

ค่าสี b* หมายถึง ค่าที่บ่งบอกความเป็นสีน้ำเงินและสีเหลืองที่อยู่ในตัวอย่างสีเหลือง (ถ้าค่าเป็น +) สีน้ำเงิน (ถ้าค่าเป็น -)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความ

แตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของมอลโทเด็กซ์ทรินในการแปรรูปน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงให้เป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

1. การหาปริมาณที่เหมาะสมของมอลโทเด็กซ์ทรินในการแปรรูปน้ำสกัดจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงให้เป็นผง

น้ำที่สกัดได้จากซังข้าวโพดหวานสีม่วง นำไปเอนแคปซูเลชั่น โดยนำสารเอนแคปซูเลติ้งด้วยมอลโทเด็กซ์ทริน ในปริมาณความเข้มข้น 3, 5 และ 7% โดยน้ำหนัก (w/w) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยใช้เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) เก็บตัวอย่างผงในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท แล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ

2. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (2000)

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงจำนวน 3 กรัม (ชั่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน) เกลี่ยใส่ในถ้วยโลหะที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักมาก่อนแล้ว (W_1) นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นำออกจากตู้อบมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) ชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนน้ำหนักคงที่ โดยน้ำหนักที่ชั่งได้ไม่ควรต่างจากครั้งแรกเกิน 0.0020 กรัม คำนวณหาเปอร์เซ็นความชื้น ดังสมการที่ (2)

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นความชื้น} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100 \qquad (2)$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักของจานโลหะ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของจานโลหะ (กรัม) + น้ำหนักผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงก่อนอบ (กรัม)

W_3 = น้ำหนักของจานโลหะ (กรัม) + น้ำหนักผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงหลังอบ (กรัม)

2) ค่า water activity (a_w) ด้วยเครื่อง Water activity meter

วิธีการวิเคราะห์

บรรจุผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงลงในตลับพลาสติก (a_w box) โดยบรรจุไม่ให้เกินระดับที่กำหนดของตลับ แล้วนำไปวัดค่า aw ด้วยเครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (Water Activity Meter ; Aqua Lab:model series 3, Decagon Device Inc.,USA)โดยวางตลับลงใน chamber ของเครื่องวัด ตั้งทิ้งไว้จนสภาพภายใน chamber สมดุลที่อุณหภูมิที่กำหนดไว้แล้วจึงอ่านค่า a_w ของตัวอย่าง

3) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

4) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

5) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable Acidity; TA) (AOAC, 2000) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

6) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH diferrential ตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1968) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

3. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ค่าสี L*, a* และ b* ด้วยเครื่องมือ Color-meter วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

2) ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility index; WSI) ตามวิธีของ Kha, *et al*. (2010)

เตรียมตัวอย่าง โดยการชั่งตัวอย่างผง 0.5 □□□□ (□□□□□□□□□□□□□) □□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□ (□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□นแล□ว) □□□□□□□□□□□□□ 6 มิลลิลิตร ผสมให□เ ข □ากัน แช□ใ น อ □างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว□□□□ 30 °C และเขย□□□□□□□□□□□□□□□□ 174 รอบต□□□□□□ เ ป □นเวลา 30 □□□□ □□□มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 ร อ บ ต □□□□□□ เ ป □นเวลา 15 □□□□□□□□□วนใสลงในจานระเหยที่ ทราบน้ำหนักและทำการระเหยบนอ□□□□□□□□□□□□□□□□ง จึงนำไปอบในตู□อ บ ล ม ร □อนที่อุณหภูมิ 105°C □□□□□□□□□ 12 ชั่วโมง ตั้งทิ้งให□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□วชั่งน้ำหนักเพื่อใช้ในการคำนวณหาส□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□

4. การศึกษาลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

นำผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงด้วยการใช้สารเอนแคปซูเลติ้ง ได้แก่ มอลโทเด็กซ์ทริน ในปริมาณความเข้มข้น 3, 5 และ 7% มาทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศอิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) (กนกกานต์และคณะ, 2553)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากการทดลองสมบัติทางเคมีและกายภาพมาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตอนที่ 3 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้นของมอลโทเด็กซ์ทรินที่ทำให้ได้เครื่องดื่มผงจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงที่มีคุณภาพที่ดีที่สุดจากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ จากนั้นนำไปศึกษาปริมาณของ

ส่วนประกอบที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงโดยปัจจัยที่ต้องการศึกษาประกอบด้วยสามปัจจัยคือ ผงซังข้าวโพดหวาน หญ้าหวาน และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide; FOS) โดยวางแผนการทดลองแบบ Mixture Design วิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัส

1. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ค่าสี L*, a* และ b* ด้วยเครื่องมือ Color-meter วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

2) ค่าความขุ่น โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

2. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

1) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (2000) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 2

2) ค่า water activity (a_w) ด้วยเครื่อง Water activity meter วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 2

3) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

4) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS) ด้วยเครื่อง Hand refractometer วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

5) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH diferrential ตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1968) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

3. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วง

ทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี rating test ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 30 คน โดยให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่นข้าวโพด รสหวาน ความข้น และความชอบโดยรวม ด้วยเกณฑ์การให้คะแนน ดังนี้

ชอบมาก	=	5
ชอบ	=	4
เฉยๆ	=	3
ไม่ชอบ	=	2
ไม่ชอบมาก	=	1

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ response surface โดยใช้โปรแกรมทางสถิติเพื่อหาจุดที่เหมาะสมสำหรับปริมาณส่วนประอบของผลิตภัณฑ์

ตอนที่ 4 การศึกษาคุณภาพเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มจากซังข้าวโพดหวานสีม่วงผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เมื่อทราบปริมาณที่เหมาะสมในการพัฒนาสูตรของผลิตภัณฑ์ ทำการวิเคราะห์คุณภาพในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้าย

1) ค่าสี L*, a* และ b* ด้วยเครื่องมือ Color-meter วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

2) ค่าความข้น โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 3

2. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้าย

1) ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

3) ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differrential ตามวิธีการของ Fuleki และ Francis (1968) วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 1

3. การวิเคราะห์สมบัติทางจุลชีววิทยาของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้าย

1) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

วิธีการวิคราะห์

1.1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ (PCA, plate count agar, Himedia, India) 23.5 กรัมในน้ำ 1 ลิตร นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้ม คนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้มเป็นช่วงๆ ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้มแล้วลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อและฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นตัว

1.2) การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้ายมาชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีน้ำ Maximum Recovery Diluents (MRD, E. Merck, Germany) 90 มิลลิลิตร เขย่า (Dilution ที่ 10^{-1}) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร (Dilution ที่ 10^{-2}) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร (Dilution ที่ 10^{-3}) ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-3} ใส่ลง

ในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-2} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-1} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและหลอมเหลวแล้ว 10-15 มิลลิลิตร เขย่าจานเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อรวมกันกับตัวอย่างให้กระจายเข้ากันดี ปล่อยอาหารเลี้ยงเชื้อให้แข็งตัว กลับจานเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี แสดงผลการคำนวณเป็น จำนวนจุลินทรีย์/กรัมตัวอย่างอาหาร (CFU/g)

2) ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold Count) โดยวิธี Pour plate (AOAC, 2000)

2.1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA, potato dextrose agar, Himedia, India) 39.0 กรัมในน้ำ 1 ลิตร นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้ม คนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้มเป็นช่วงๆ ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้มแล้วลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อและฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นตัว เติมกรด tartaric acid ($HOOC(CHOH)_2COOH$, Carlo Erba Reagent, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นปริมาณร้อยละ 0.8 ผสมให้เข้ากัน

2.2) การตรวจปริมาณยีสต์และรา

นำเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้ายมาชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีน้ำ Maximum Recovery Diluents (MRD, E. Merck, Germany) 90 มิลลิลิตร เขย่า (Dilution ที่ 10^{-1}) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร (Dilution ที่ 10^{-2}) ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี MRD 9 มิลลิลิตร (Dilution ที่ 10^{-3}) ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-3} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-2} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างจาก dilution 10^{-1} ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ จำนวน 3 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ที่ผ่านการ

ฆ่าเชื้อและหลอมเหลว (เติมกรด tartaric acid ความเข้มข้นร้อยละ1 เป็นปริมาณร้อยละ 0.8 ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อ) 10-15 มิลลิลิตร เขย่าจานเบาๆ ให้อาหารเลี้ยงเชื้อรวมกันกับตัวอย่างให้กระจายเข้ากันดี ปล่อยอาหารเลี้ยงเชื้อให้แข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี แสดงผลการคำนวณเป็นจำนวนจุลินทรีย์/กรัมตัวอย่างอาหาร (CFU/g)

4. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มผงพร้อมดื่มผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยใช้การทดสอบด้วยวิธี 9-point hedonic scale (คะแนน 1 = ไม่ชอบมากที่สุด และ คะแนน 9 = ชอบมากที่สุด) โดยให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่น รสหวาน ความข่น และความชอบโดยรวม ใช้ผู้ทดสอบทั่วไปจำนวน 100 คน

3.5 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เดือนมกราคม 2560 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2561