

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบหลัก

- 3.1.1.1 นมวัวปราศจากไขมัน (Skim milk) จากบริษัทซีพี – เมจิ (ประเทศไทย) จำกัด
- 3.1.1.2 สารให้ความคงตัวกัวร์กัม (Guar gum) แซนแทนกัม (Xanthan gum) และแคปปา – คาราจีแนน (*kappa* –Carrageenan) จากบริษัทเบอร์ลียูเคเกอร์ จำกัด (มหาชน)
- 3.1.1.3 น้ำตาลทรายจากกลุ่มบริษัทไทยรุ่งเรือง
- 3.1.1.4 ครีมนม จากบริษัท ฟริสแลนด์ ฟู้ดส์ โพรโมสต์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)
- 3.1.1.5 นมวัวผงปราศจากไขมัน (Skim milk powder) จากบริษัทเอฟเอ กรุป (ประเทศไทย) จำกัด
- 3.1.1.6 Emulsifier ชนิด Mono-di glyceride จากบริษัทเบอร์ลียูเคเกอร์ จำกัด (มหาชน)
- 3.1.1.7 Glucose Syrup จากบริษัทเจริญถาวรซัพพลาย จำกัด
- 3.1.1.7 สีและกลิ่นรสสตรอเบอร์รี่ จากบริษัทเบอร์ลียูเคเกอร์ จำกัด (มหาชน)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อโพรไบโอติกชนิด *Lactobacillus casei* 01 จาก Chr. Hansen A/S Co., Ltd., เดนมาร์ก

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

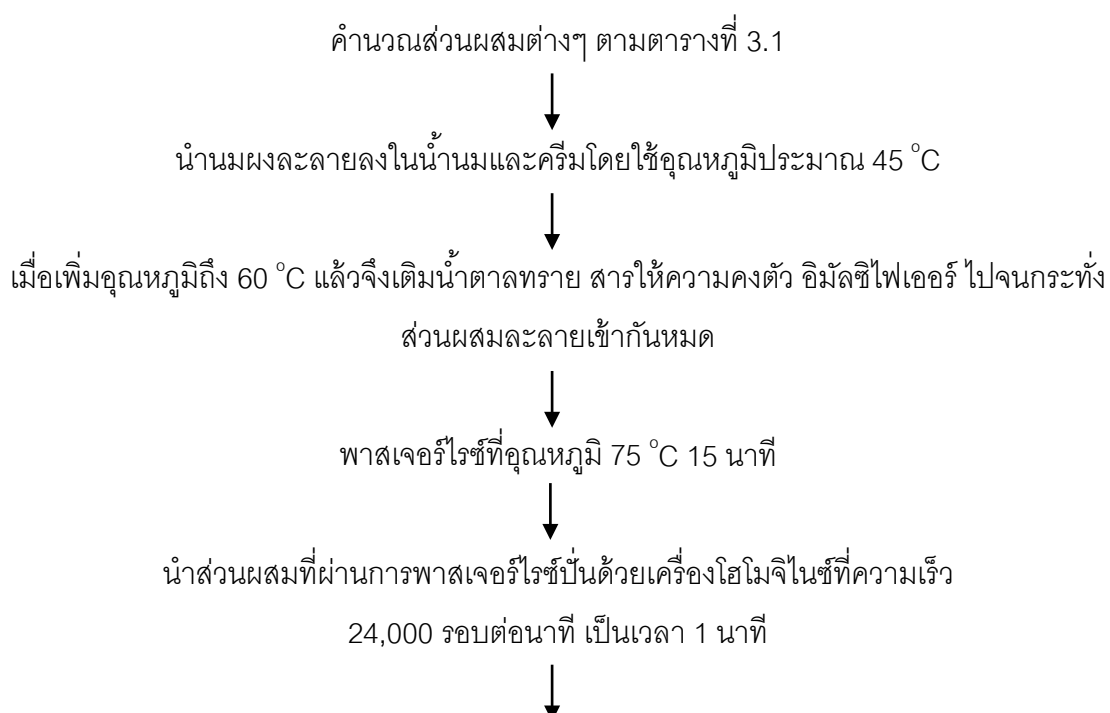
- 3.1.3.1 เครื่องปั่นไอศกรีม Homemade รุ่น HOM-4002 ประเทศจีน
- 3.1.3.2 ตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -20 °C) Whirlpool รุ่น WCF-65L ประเทศไทย
- 3.1.3.3 ตู้เย็นยี่ห้อ Whirlpool ประเทศไทย
- 3.1.3.4 เทอร์โมมิเตอร์ แบบ Multi-Thermo ยี่ห้อ Ebro

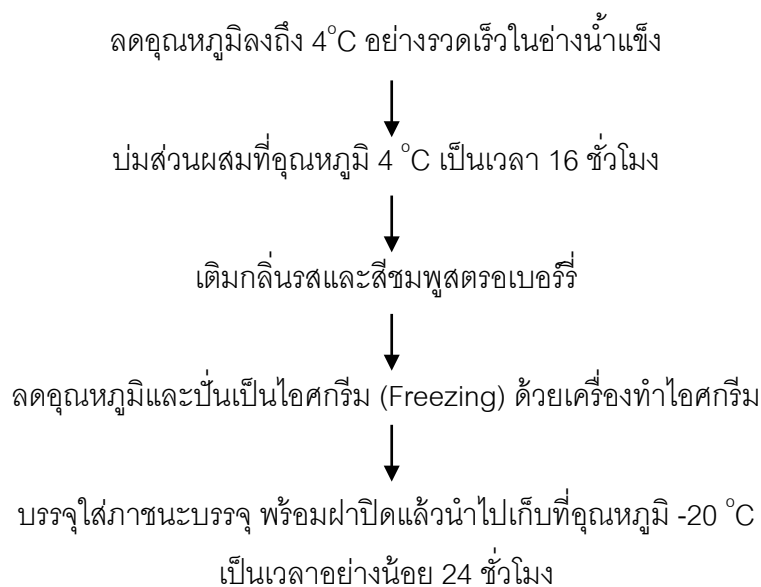
- 3.1.3.5 เครื่องชั่งยี่ห้อ Sartorius รุ่น LC120015 ประเทศไทย
- 3.1.3.6 เครื่อง Homogenizer ยี่ห้อ Yspral ประเทศเยอรมนี
- 3.1.3.7 เครื่องวัดสมบัติวิทยากระแส Rotational Rheometer (Malvern Model Kinexus pro, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.3.8 Hot air Oven ยี่ห้อ WTB binder ประเทศเยอรมนี
- 3.1.3.9 ห้องแช่เย็น 4 °C และห้องแช่แข็ง -18 °C
- 3.1.3.10 Autoclave ยี่ห้อ TOMY ประเทศญี่ปุ่น
- 3.1.3.11 Microprocessor Incubator Control i250
- 3.1.3.12 วัสดุอุปกรณ์เครื่องครัว ได้แก่ หม้อ หม้อหนึ่งลังถึง จาน ชาม ท็อปซีซั่น ถาดอะลูมิเนียม เป็นต้น

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมตัวอย่างไอศกรีมไขมันต่ำ ดัดแปลงจากวิธีการของ Marshall และ คณะ (2003) ดังรูปที่ 3.1

3.2.1 วิธีการผลิตไอศกรีม





รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตไอศกรีม

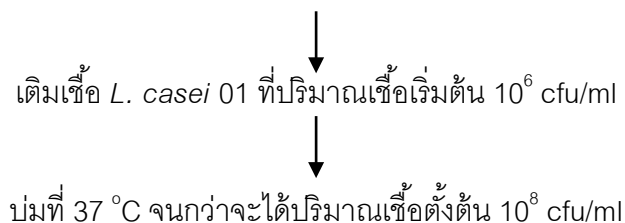
ตารางที่ 3.1 สูตรไอศกรีมไขมันต่ำ (Marshall และคณะ, 2003)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
Fat	3
Milk solid non fat (MSNF)	13
Sucrose	11
Glucose Syrup	6
Emulsifier	0.1
Stabilizer	0.30 - 0.32

3.2.2 วิธีการเตรียม โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. casei* 01

การเตรียมโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. casei* 01 ที่อยู่ในรูปผงแห้ง ทำได้โดยการชั่งน้ำหนักน้ำหนักผงแห้งมาละลายใน MRS broth ที่เลี้ยงผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมเชื้อที่ได้ในขั้นตอนตามรูปที่ 3.2

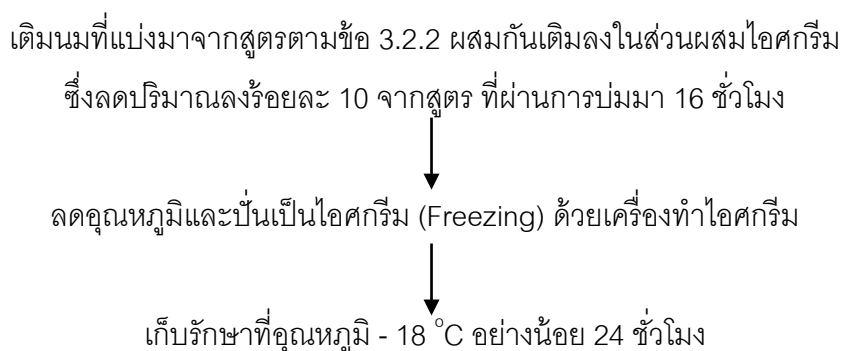
แบ่งนมขาดมันเนยมาร้อยละ 10 ของปริมาณนมที่คำนวณตามสูตร ผสมอินูลินร้อยละ 2 (ของนมที่แบ่งมา) ใส่เชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติก

3.2.3 วิธีการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติก

การเตรียมตัวอย่างไอศกรีมโพรไบโอติก แสดงดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการผลิตไอศกรีมโพรไบโอติก

3.3 การศึกษาผลของกระบวนการแช่เยือกแข็ง (Freezing) ในกระบวนการผลิตไอศกรีมต่อคุณภาพของไอศกรีมและไอศกรีมโพรไบโอติก

ผลิตส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมที่ใช้สารให้ความคงตัว 4 ชนิดได้แก่เดิมสารให้ความคงตัวชนิดแซนแทนกัม (X) แซนแทนกัมร่วมกับแคปปา-คาราจีแนน (XC) กัวร์กัม (G) และกัวร์กัมร่วมกับแคปปา-คาราจีแนน (GC) สำหรับส่วนผสมไอศกรีมสูตรควบคุมไขมันต่ำ (4 สูตร) และส่วนผสมไอศกรีมโพรไบโอติกไขมันต่ำที่ใช้เชื้อโพรไบโอติกชนิด *L. casei* 01 ร่วมกับการใช้สารให้ความคงตัวชนิดแซนแทนกัม (PX) แซนแทนกัมร่วมกับแคปปา-คาราจีแนน (PXC) กัวร์กัม (PG) และกัวร์กัมร่วมกับแคปปา-คาราจีแนน (PGC) (4 สูตร) ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รหัสชื่อของไอศกรีมโฟรโปโอดิกและไอศกรีมสูตรควบคุมที่แปรชนิดและความเข้มข้นของสารให้ความคงตัวชนิดต่างๆ

สูตร	ความเข้มข้นของไอศกรีมแต่ละสูตร	รหัส
โฟรโปโอดิก	<i>L. casei</i> 01 + แชนแทนกัมร้อยละ 0.3	PX
	<i>L. casei</i> 01 + แชนแทนกัมร้อยละ 0.3 + แคปปา-คาราจีแนนร้อยละ 0.02	PXC
	<i>L. casei</i> 01 + กัวร์กัมร้อยละ 0.3	PG
	<i>L. casei</i> 01 + กัวร์กัมร้อยละ 0.3 + แคปปา-คาราจีแนนร้อยละ 0.02	PGC
ควบคุม	แชนแทนกัมร้อยละ 0.3	X
	แชนแทนกัมร้อยละ 0.3 + แคปปา-คาราจีแนนร้อยละ 0.02	XC
	กัวร์กัมร้อยละ 0.3	G
	กัวร์กัมร้อยละ 0.3 + แคปปา-คาราจีแนนร้อยละ 0.02	GC

3.3.1 ลักษณะกายภาพของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม

การทดสอบลักษณะกายภาพของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมทั้ง 8 สูตรที่ผ่านการบ่มที่ 4 °C นาน 16 ชั่วโมง ทำได้โดยการวัดค่าทางสมบัติวิทยากระแส 2 วิธี ได้แก่แบบการทดสอบแบบให้แรงเฉือน (Steady shear testing) และการทดสอบเชิงพลวัต (Dynamic หรือ Oscillation testing)

3.3.1.1 การทดสอบสมบัติทางวิทยากระแสแบบให้แรงเฉือน (Steady shear testing) ของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม

ประเมินสมบัติทางวิทยากระแสแบบให้แรงเฉือนของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม โดยใช้เครื่อง Rotational Rheometer ใช้หัววัดแบบ Cone and Plate geometry ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 mm และมีความลาดเอียงของหัววัดเท่ากับ 4 องศา ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °C โดยการวัดจะเริ่มเมื่ออุณหภูมิคงที่เป็นเวลา 10 นาที การทดสอบเป็นแบบการเพิ่มอัตราเฉือน (Shear rate sweep) ในช่วง 10 – 100 s⁻¹ ศึกษาสมบัติทางวิทยากระแสโดยเลือกรูปแบบสมการของ Herchel – Bulkey แสดงดังสมการ

$$\sigma = \sigma_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad \text{สมการที่ 3.1}$$

โดย	σ	คือ แรงเค้นเฉือน (Shear stress, Pa.s)
	$\dot{\gamma}$	คือ อัตราเฉือน (Shear rate, s^{-1})
	K	คือ ค่าดัชนีความคงตัว (Consistency index)
	n	คือ ค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล (Flow behavior index)
	σ_0	คือความเค้นคราก มีหน่วยเป็น (Yield stress, Pa)

และวัดค่าความหนืดปรากฏ (Apparent viscosity, η) ที่อัตราเฉือนเท่ากับ $50 s^{-1}$ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงค่าแรงเฉือนที่เกิดขึ้นภายในปากของมนุษย์สำหรับอาหารที่มีความหนืดต่ำ (Morris, 1995)

3.3.1.2 การสอบเชิงพลวัต (Dynamic หรือ Oscillation testing) ของ ส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม

การสอบเชิงพลวัตของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมประเมินโดยใช้เครื่อง Rotational Rheometer การทดสอบเป็นการประเมินสมบัติวิสโคอีลาสติก (Viscoelastic) ซึ่งเป็นสมบัติร่วมระหว่างของแข็งยืดหยุ่น (Elastic solid) และของเหลวไหลหนืด (Viscous fluid) ของตัวอย่าง เป็นการทดสอบโดยควบคุมให้ ความเครียด (Strain) คงที่แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงความเค้น (Stress) ไปตามความถี่ของการสั่นอุณหภูมิคงที่ ในการทดสอบหาความเครียด (Strain) ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม ใช้วิธี Amplitude sweep เพื่อใช้ในการทำนายช่วง Linear Viscoelastic Region (LVR) ของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม โดยแสดงสมบัติวิสโคอีลาสติกเชิงเส้น (Linear viscoelastic) ซึ่งแสดงค่าระหว่าง Elastic modulus (G') และค่า Viscous modulus (G'') โดยกำหนดให้มีความถี่ (Frequency) 1.0 เฮิรตซ์ ช่วงร้อยละความเครียด Complex shear strain(%) 0.001-10 กำหนด gap ระหว่างหัววัดและตัวอย่าง 1.5 มิลลิเมตร ใช้หัววัด 40 มิลลิเมตร Cone and Plate geometry มีความลาดเอียงของหัววัดเท่ากับ 4 องศา และอุณหภูมิขณะทดสอบเท่ากับ 4 °C

3.3.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีม

วัดค่า pH ของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมโดยใช้เครื่อง pH meter

3.3.3 ค่าการขึ้นฟู (Overrun)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างของส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมก่อนทำการลดอุณหภูมิ และตัวอย่างไอศกรีมหลังลดอุณหภูมิ กำหนดปริมาตรให้คงที่ แล้วนำมาคำนวณตามสูตร ดังนี้;

$$\text{ร้อยละการขึ้นฟู} = \frac{(\text{น้ำหนักของส่วนผสมไอศกรีม} - \text{น้ำหนักของไอศกรีม})}{\text{น้ำหนักของไอศกรีม}} \times 100$$

3.3.4 การรอดชีวิตของเชื้อ *L. casei* 01

การหาปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตจากกระบวนการแช่แข็งของไอศกรีม (Freezing) ทำได้โดยนำตัวอย่างส่วนผสมพร้อมทำไอศกรีมและตัวอย่างไอศกรีมปริมาณ 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 โดยมีมวลต่อปริมาตร โดยการใช้การเจือจางแบบ 10-serial dilutions ทำการ Pour plate โดยใช้ MRS Agar (Becton, Dickinson and Company, ประเทศฝรั่งเศส) แล้วบ่มที่ 37°C แบบไม่มีออกซิเจน นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *L. casei* 01 ในจานเพาะที่จำนวน 30 – 300 โคโลนี ซึ่งมีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวทึบมัน เงามา ค้นหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในหน่วย log โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.3.5 สถิติที่ใช้ในการประเมินผล

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 8 ทรีทเมนต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA (Analysis of Variance) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.4 การศึกษาอิทธิพลของการเก็บรักษาต่อคุณภาพของไอศกรีมและไอศกรีมโพรไบโอติก

เก็บรักษาไอศกรีมที่ใช้สารให้ความคงตัว 4 ชนิดได้แก่เติมสารให้ความคงตัวชนิดแซนแทนกัม แซนแทนกัมร่วมกับแคปปา - คาราจีแนน กัวร์กัม และกัวร์กัมร่วมกับแคปปา - คาราจีแนน (4 สูตร) และไอศกรีมโพรไบโอติกที่ใช้สารให้ความคงตัวชนิดแซนแทนกัม แซนแทนกัมร่วมกับแคปปา - คาราจีแนน กัวร์กัม และกัวร์กัมร่วมกับแคปปา-คาราจีแนน (4 สูตร) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 210 วัน

3.4.1 ลักษณะกายภาพของไอศกรีม

ทดสอบลักษณะกายภาพของไอศกรีมทั้ง 8 สูตร โดยการวัดค่าทางสมบัติวิทยากระแสน้ำแบบการทดสอบเชิงพลวัต และสมบัติการละลายของไอศกรีม

3.4.1.1 การทดสอบเชิงพลวัต (Dynamic หรือ Oscillation testing) ของไอศกรีม

การทดสอบเชิงพลวัตของตัวอย่างไอศกรีมประเมินโดยใช้เครื่อง Rotational Rheometer การทดสอบเป็นการประเมินสมบัติวิสโคอีลาสติก โดยควบคุมให้

ความเครียดคงที่แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงความเค้น ไปตามความถี่ของการสั่นโดยที่อุณหภูมิคงที่ ในการทดสอบหาความเครียด เหมาะสมสำหรับตัวอย่างไอศกรีม ใช้วิธี Amplitude sweep เพื่อใช้ในการทำนายช่วง Linear Viscoelastic Region (LVR) ของไอศกรีมโดยแสดงสมบัติวิสโคอีลาสติกเชิงเส้น ซึ่งแสดงค่าระหว่าง Elastic modulus (G') และค่า Viscous modulus (G'') โดยกำหนดให้มีความถี่ 1.0 เฮิรตซ์ ช่วงร้อยละความเครียด 0.001-10 กำหนด gap 1.5 มิลลิเมตร ใช้หัววัด 40 มิลลิเมตร Cone and Plate geometry มีความลาดเอียงของหัววัดเท่ากับ 4 องศา และอุณหภูมิขณะทดสอบเท่ากับ -3°C โดยตัวอย่างไอศกรีมถูกสุ่มมาจากกล่องที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18°C ไอศกรีมจะถูกตัดออกเป็นชิ้นขนาด $20 \times 20 \times 2$ มิลลิเมตร ข้อมูลที่ได้นำมาสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่า G' , G'' และ η^* กับค่า ω ของไอศกรีม หาค่า K' , K'' และ K^* จากจุดตัดของกราฟและหาค่า n' , n'' และ n^* จากความชันโดยเลือกรูปแบบสมการของ Power law ดังสมการที่ 3.2 – 3.4 จากรูปแบบสมการที่ได้แทนค่าสมการที่ $\omega = 10$ เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของสารให้ความคงตัวและโพรไบโอติกต่อค่า G' ของไอศกรีมในระหว่างการเก็บรักษา และหาอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า G' จากค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $G'(\omega = 10)$ กับอายุการเก็บรักษา โดยการหารูปแบบสมการและกราฟความสัมพันธ์ทำได้โดยใช้โปรแกรม Sigma plot 11.0

$$G' = K'(\omega)^{n'} \quad \text{สมการที่ 3.2}$$

$$G'' = K''(\omega)^{n''} \quad \text{สมการที่ 3.3}$$

$$\eta^* = K^*(\omega)^{n^*-1} \quad \text{สมการที่ 3.4}$$

โดย	G'	คือ ค่าโมดูลัสยืดหยุ่น (Pa)
	G''	คือ ค่าโมดูลัสหนืด (Pa)
	η^*	คือ ความหนืดเชิงซ้อน (Pa.s)
	ω	คือ ความเร็วเชิงมุม (rad.s^{-1})
	K' , K'' และ K^*	คือจุดตัดแกน (Pa)
	n' , n'' และ n^*	คือความชัน

3.4.1.2 การทดสอบสมบัติการละลายของไอศกรีม

การทดสอบสมบัติการละลาย 2 ลักษณะคือ First drip และเวลาในการละลายทั้งหมด (Total melting time) โดยชั่งตัวอย่างไอศกรีม 25 กรัม วางบนตะแกรงที่มีรูตะแกรงขนาด 0.2 เซนติเมตร เหนือบีกเกอร์ที่อุณหภูมิ 25°C แล้วจับเวลาตั้งแต่วางตัวอย่างไอศกรีมบนตะแกรงจนไอศกรีมหยดแรกตกลงมาในบีกเกอร์ จะได้ค่า First drip จับเวลาต่อไปจนไอศกรีมละลายหมด เวลาตั้งแต่วางตัวอย่างไอศกรีมลงบนตะแกรงจนกระทั่งตัวอย่างไอศกรีมละลายทั้งหมด คือเวลาในการละลายทั้งหมด (Total melting time)

3.4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของไอศกรีม

วัดค่า pH ของไอศกรีมโดยใช้เครื่อง pH meter

3.4.3 การรอดชีวิตของเชื้อ *L. casei* 01

การหาปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่รอดชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา ทำได้โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.85 โดยมวลต่อปริมาตร โดยการใช้การเจือจางแบบ 10 - serial dilutions ทำการ Pour plate โดยใช้ MRS Agar (Becton, Dickinson and Company, ประเทศฝรั่งเศส) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C แบบไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ *L. casei* 01 ซึ่งมีลักษณะเป็นโคโลนีสีขาวทึบ มั่นเงา คำนวณหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในหน่วย log โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.4.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำไอศกรีมสูตรควบคุมและไอศกรีมโพรไบโอติกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 °C มาเสิร์ฟให้ผู้ทดสอบแบบสุ่มจำนวน 112 คน โดยผู้ทดสอบแต่ละคนได้รับตัวอย่างคนละ 4 ตัวอย่าง ประเมินทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้วิธี 9 - point hedonic scale (1 = ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 = ชอบมากที่สุด)

3.4.5 สถิติที่ใช้ในการประเมินผล

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) สำหรับการทดลองทางกายภาพ เคมีและทางจุลินทรีย์ จำนวน 8 ทรีทเมนต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA (Analysis of Variance) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

วางแผนการทดลองแบบ Balanced Incomplete Block Design (BIB) สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส จำนวน 8 ทรีทเมนต์ ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 112 คน โดยผู้ทดสอบแต่ละคนได้รับตัวอย่างคนละ 4 ตัวอย่าง วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Different (LSD)