บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์สาหร่าย และวัตถุดิบ

1. สายพันธุ์สาหร่าย

สาหร่าย *Spirulina platensis* IFRPD 1182 ได้รับมาจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Institute of Food Research and Product Development: IFRPD)

2. วัตถุดิบ

2.1 ข้าวกล้องหอมมะลิ จากเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดสระแก้ว
2.2 กล้วยตาก ตรา Gourmet THAI บริษัท ชายน้อยฟู้ด จำกัด
2.3 เม็ดมะม่วงหิมพานต์ทอด ซื้อมาจากห้างเดอะมอลล์ งามวงศ์วาน
2.4 เมล็ดฟักทองอบ ตราฟลาวเวอร์ ฟู้ด บริษัท ฟลาวเวอร์ฟูด (ประเทศไทย) จำกัด
2.5 งาขาว ตราแนชเชอรัล แอนด์ พรีเมี่ยม บริษัท แนชเชอรัล แอนด์ พรีเมี่ยม ฟู้ด จำกัด
2.6 น้ำตาลทราย ตราลิน บริษัท น้ำตาลไทยรุ่งเรือง
2.7 น้ำตาลทรายแดง ตรามิตรผล บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด
2.8 น้ำผึ้งสวนจิตรลดา โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา
2.9 ไฮฟรักโทสไซรัป
2.10 เนยจืด ตราออร์คิด บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด
2.11 น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ ตราดัชมิลล์ บริษัท ดัชมิลล์ จำกัด
2.12 หัวนมผงนิวซีแลนด์ (Full cream milk powder)
2.13 หางนมผง ตรามิสไอศกรีม
2.14 สารให้ความคงตัว (CMC; Carboxy methyl cellulose)
2.15 เพกติน บริษัท ฟู้ดแอนด์คอสเมติก ซิสเต็ม จำกัด
2.16 เกลือ ตราปรุงทิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด
2.17 โยเกิร์ตรสออริจินัส Bio Duo Probiotic ตราดัชชี่ (ชนิดที่เสริมแบคทีเรียพรอไบโอติก *Lactobacillus lactis*)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย

1. ตู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบควบคุมอุณหภูมิขนาด 30×60×40 ลูกบาสก์เซนติเมตร มีปั๊มช่วยกระจายอุณหภูมิให้สม่ำเสมอทั่วตู้ และใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 40 วัตต์ 6 หลอด เป็นแหล่งให้แสง สามารถปรับความเข้มแสงด้วยการกำหนดระยะระหว่างหลอดไฟกับพื้นที่ผิวที่ตั้งของหลอดทดลองที่แสงส่องมาถึง และวัดความเข้มแสงโดยใช้เครื่องวัดความเข้มแสง และอุปกรณ์ตั้งเวลาเปิดและปิดไฟ

2. หลอดทดลองสำหรับเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ขนาดยาว 35 เซนติเมตร ความจุ 200 มิลลิลิตร เป็นหลอดแก้วปลายแหลม ปิดด้วยจุกซิลิโคน เจาะรู 2 รู สวมท่อแก้วสำหรับให้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ผสมกับอากาศจากเครื่องปั๊มอากาศผ่านเข้าไปได้

3. บ่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาด 250 ลิตร

4. ถังก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมอุปกรณ์หัวจ่าย

5. เครื่องวัดความเข้มแสง (Light meter); (Tecpel 530, Taiwan)

6. อุปกรณ์วัดปริมาณการไหลของอากาศ (Air flow meter)

7. ผ้ากรองสาหร่ายขนาดความถี่ 50 ไมครอน

อุปกรณ์ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

1. ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3. เครื่องชั่งละเอียดชนิด 3 ตำแหน่ง

อุปกรณ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน

1. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)

2. กระทะ

3. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

4. เครื่องปั่นไอศกรีม

5. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer)

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน

1. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water activity, Aw)
2. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer)
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Hand refractometer)
4. เครื่องวัดค่าสี L* a* b* (Colorimeter)

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน

1. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
2. บิวเรตพร้อมขาตั้ง
3. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis)
4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์วิธีต่าง ๆ

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน

1. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubators)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

1. อุปกรณ์ทดสอบ
2. แบบทดสอบ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบโฟโตออโตทรอฟระดับบ่อเปิดรางคู่เพื่อการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่าย

1.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่ายขั้นที่ 1

ดำเนินตาม Dejsungkranont, Chisti, and Sirisansaneeyakul (2017, pp. 1173–1188) โดยนำสาหร่ายสไปรูลิน่ามาเพาะเลี้ยงในหลอดเพาะเลี้ยงสาหร่ายขนาด 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว Zarrouk´s medium (Zarrouk, 1966) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 9.0 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (OD_{560}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 15 กิโลลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน และใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์ชนิดแสงขาวนวล (40 วัตต์) เป็นแหล่งกำเนิดแสง ให้อากาศที่มีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 1–2 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของอากาศ ที่อัตรา 0.6 VVM (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที) ดำเนินการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำกล้าเชื้อไปใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อในขั้นที่ 2 ต่อไป

1.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อสาหร่ายขั้นที่ 2

นำกล้าเชื้อสาหร่ายขั้นที่ 1 ข้างต้นมาขยายปริมาณในอ่างเพาะเลี้ยงสาหร่ายกลางแจ้งขนาด 250 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร Zarrouk´s medium ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 100 ลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (OD_{560}) เท่ากับ 0.2 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน หรือจนมีความขุ่นเท่ากับ 0.4 ในแต่ละวันจะมีการปรับปริมาตรของอาหารเหลวให้ได้เท่ากับ 100 ลิตร โดยการเติมน้ำเพื่อทดแทนน้ำที่ระเหยไป (Dejsungkranont, Chisti, & Sirisansaneeyakul, 2017, pp. 1173–1188)

1.2 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า

เติมอาหาร Zarrouk´s medium ลงในบ่อเพาะเลี้ยงขนาด 250 ลิตร ที่มีกล้าเชื้อสาหร่ายในขั้นที่ 2 จนได้ปริมาตรรวม 200 ลิตร ในระหว่างการเพาะเลี้ยงควบคุมความ

เข้มแสงประมาณ 5 ± 2 กิโลลักซ์ เพาะเลี้ยงนาน 14 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวชีวมวลสาหร่ายโดยใช้ผ้ากรองขนาดรูพรุน 50 ไมครอน แล้วล้างชีวมวลให้สะอาดด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบลมร้อน นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด (Retsch ZM1) ที่มีขนาดรูพรุนของตะแกรงร่อนเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร บรรจุชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้ลงถุงอลูมินัมฟอยล์ภายใต้สุญญากาศ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การสกัดซี-ไฟโคไซยานินและการวิเคราะห์คุณภาพกากชีวมวลเหลือทิ้งของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้จากการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

งานวิจัยนี้ได้เลือกวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeatedly freezing and thawing, RFT) ในการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน เนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกไม่ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่มีราคาแพง ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ ราเชนทร์ ดวงศรี (2552) โดยนำชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่บดละเอียดแล้วมาผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) โดยใช้ปริมาณชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่า 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปละลายที่อุณหภูมิห้องแล้วนำกลับไปแช่เยือกแข็ง โดยทำกระบวนการดังกล่าวซ้ำ 3 รอบ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนสกัดซี-ไฟโคไซยานินออกจากกากชีวมวล จากนั้นนำกากชีวมวลเหลือทิ้งของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ได้จากการสกัดซี-ไฟโคไซยานินดังกล่าวไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบลมร้อน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดที่มีขนาดรูพรุนของตะแกรงร่อนเท่ากับ 0.25 มิลลิเมตร จากนั้นบรรจุลงในถุงฟอยล์ภายใต้สุญญากาศเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารฟังก์ชันต่อไป นำกากชีวมวลอบแห้งส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) (AOAC, 2002) ความเข้มข้นของซี-ไฟโคไซยานิน (Bennett & Bogorad, 1973, pp. 419–435) ปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ (El–Baky & El–Baroty, 2008, pp. 292–300) เปรียบเทียบกับชีวมวลสาหร่ายอบแห้งก่อนการสกัดซี-ไฟโคไซยานิน

3. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า

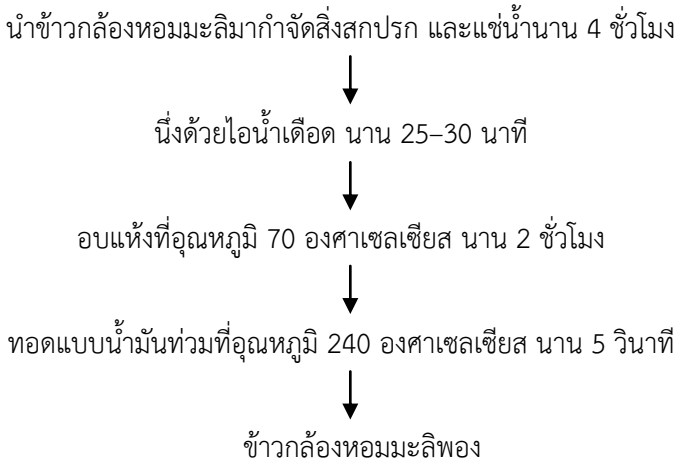
3.1 การศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งที่เหมาะสม

การทดลองนี้ใช้ข้าวกล้องหอมมะลิเป็นวัตถุดิบหลักในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเป็นแหล่งของวิตามินบีรวม ฟอสฟอรัส แคลเซียม ธาตุเหล็ก และโปรตีน อีกทั้งยังมีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพมากมาย อาทิ บรรเทาอาการอ่อนเพลีย ลดอาการปวดกล้ามเนื้อ ป้องกันโรคผิวหนังบางชนิด บำรุงสมอง ป้องกันการเกิดโรคเหน็บชา และยังมีใยอาหารสูงที่ส่งผลดีต่อระบบขับถ่าย และช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ปัจจุบันพบว่าข้าวกล้องได้รับการยอมรับในการบริโภคอย่างแพร่หลาย (กชแก้ว สุริยะ และชวกร วรสุวรรณรักษ์, 2559, น. 1–20) ผู้วิจัยได้คัดเลือกสูตรของ รัชนก กองประดิษฐ์ และแก้วตา กล่ำเจริญ (2560) เป็นสูตรมาตรฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า ซึ่งประกอบด้วย ข้าวกล้องหอมมะลิพอง กล้วยตาก เม็ดมะม่วงหิมพานต์ทอด เมล็ดฟักทองอบ งาขาวคั่ว น้ำตาลทราย แดงน้ำผึ้ง ไฮฟรักโทสไซรัป และเนย โดยทดลองเสริมกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งลงในส่วนผสมของสูตรมาตรฐานข้างต้น และผันแปรปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง 4 ระดับ คือ 0 2 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ได้สูตรในการทดลองทั้งหมด 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.1 สำหรับวิธีการเตรียมข้าวกล้องหอมมะลิพองและข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า แสดงดังภาพที่ 3.1 และภาพที่ 3.2 ตามลำดับ

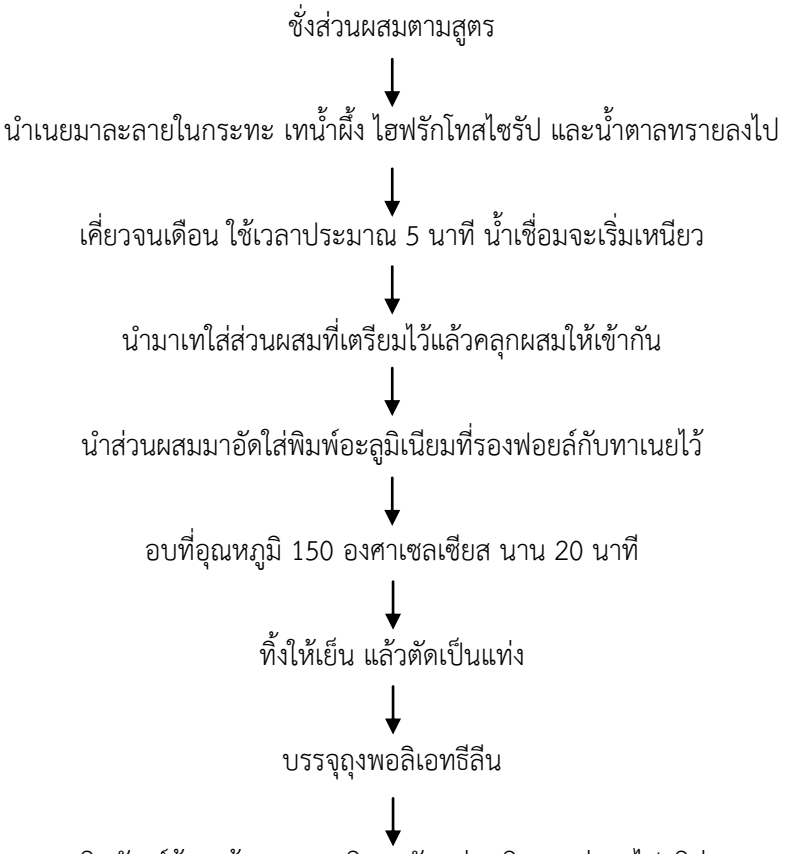
ดำเนินการคัดเลือกสูตรผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสม โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้แต่ละสูตรมาตัดให้มีขนาดประมาณ 2.5×5×1.5 เซนติเมตร แล้วนำไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 50 คน เพื่อประเมินและให้คะแนนความชอบต่อคุณลักษณะด้านต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้ 9 Point Hedonic Scale ให้คะแนน 1–9 (1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 คือ ชอบมากที่สุด) จากนั้นสรุปผลการประเมินเพื่อคัดเลือกสูตรผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสมเพื่อนำไปทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเทียบกับส่วนผสมของสูตรมาตรฐาน 100 กรัม ในการศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
สูตรมาตรฐาน				
ข้าวกล้องหอมมะลิพอง	27.00	27.00	27.00	27.00
กล้วยตาก	15.00	15.00	15.00	15.00
เม็ดมะม่วงหิมพานต์ทอด	11.00	11.00	11.00	11.00
เมล็ดฟักทองอบ	5.00	5.00	5.00	5.00
งาขาวคั่ว	5.00	5.00	5.00	5.00
น้ำตาลทรายแดง	7.00	7.00	7.00	7.00
น้ำผึ้ง	15.00	15.00	15.00	15.00
ไฮฟรักโทสไซรัป	6.10	6.10	6.10	6.10
เนยจืด	8.90	8.90	8.90	8.90
กากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง	0.00	2.00	4.00	6.00



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตข้าวกล้องหอมมะลิพอง (ปาริสุทธิ์ สงทิพย์, 2550)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า (รัชนก กองประดิษฐ์ และแก้วตา กล่ำเจริญ, 2560)

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าสุดท้าย

3.2.1 คุณภาพทางกายภาพ

3.2.1.1 ปริมาณน้ำอิสระ (Water activity, Aw) โดยใช้เครื่อง Water activity meter

3.2.1.2 เนื้อสัมผัสด้านความแข็ง (Hardness) โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) และใช้หัววัด Part No. p/100

3.2.2 คุณภาพทางเคมี

3.2.2.1 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

3.2.2.2 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2002)

3.2.2.3 ปริมาณไขมัน (AOAC, 2002)

3.2.2.4 ปริมาณเส้นใยหยาบ (AOAC, 2002)

3.2.2.5 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2002)

3.2.2.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2002)

3.2.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์

3.2.3.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A)

3.2.3.2 จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B)

3.2.3.3 จำนวนโคลิฟอร์ม โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

3.2.3.4 จำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

3.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าสุดท้ายบรรจุในถุงพอลิเอทธีลีนและบรรจุกล่องกระดาษทึบ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพทุก 2 วัน ดังนี้

3.3.1 คุณภาพทางกายภาพ

3.3.1.1 ปริมาณน้ำอิสระ (Water activity, Aw) โดยใช้เครื่อง Water activity meter

3.3.1.2 เนื้อสัมผัสด้านความแข็ง (Hardness) โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) และใช้หัววัด Part No. p/100

3.3.2 คุณภาพทางจุลินทรีย์ (เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

3.3.2.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A)

3.3.2.2 จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B)

3.3.2.3 จำนวนโคลิฟอร์ม โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

3.3.2.4 จำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

4. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า

4.1 การศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งที่เหมาะสม

การทดลองนี้ผลิตไอศกรีมชนิดซอฟโดยใช้สูตรที่ดัดแปลงจากสูตรของ อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ (2552) เป็นสูตรมาตรฐานในการพัฒนา ซึ่งประกอบด้วย น้ำนม นมผง น้ำ น้ำตาลทราย สารให้ความคงตัว (CMC; Carboxy methyl cellulose) และเกลือ โดยผันแปรการเสริมกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง 4 ระดับ คือ 0 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ได้สูตรในการทดลองทั้งหมด 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.2 โดยกรรมวิธีการผลิตไอศกรีมชนิดซอฟดัดแปลงจากวิธีของ พัชรินทร์ รักถาวร (2542) ดังแสดงในภาพที่ 3.3

คัดเลือกสูตรผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสม โดยตักไอศกรีมที่ผลิตได้แต่ละสูตรบรรจุลงภาชนะแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -17 ถึง -21 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพื่อคัดเลือกสูตรที่เหมาะสม โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 50 คน ประเมินและให้คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้ 9 Point Hedonic Scale ให้คะแนน 1–9 (1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 คือ ชอบมากที่สุด)

ตารางที่ 3.2 ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเทียบกับส่วนผสมของสูตรมาตรฐาน 100 กรัม ในการศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
สูตรมาตรฐาน				
น้ำนม	66.00	66.00	66.00	66.00
นมผง	16.30	16.30	16.30	16.30
น้ำ	9.14	9.14	9.14	9.14
น้ำตาลทราย	8.12	8.12	8.12	8.12
สารให้ความคงตัว (CMC)	0.40	0.40	0.40	0.40
เกลือ	0.05	0.05	0.05	0.05
กากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง	0.00	0.50	1.00	1.50

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าสุดท้าย

4.2.1 คุณภาพทางกายภาพ

4.2.1.1 อัตราการขึ้นฟู (Overrun) ตามวิธีการของ Arbuckle (1986)

4.2.1.2 อัตราการหลอมละลาย (Melt-down rate) ตามวิธีการของ Rosalina and Richard (2004, pp. 255–262)

4.2.2 คุณภาพทางเคมี

4.2.2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ Hand refractometer

4.2.2.2 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

4.2.2.3 ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2002)

4.2.2.4 ปริมาณไขมัน (AOAC, 2002)

4.2.2.5 ปริมาณเส้นใยหยาบ (AOAC, 2002)

4.2.2.6 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2002)

4.2.2.7 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2002)

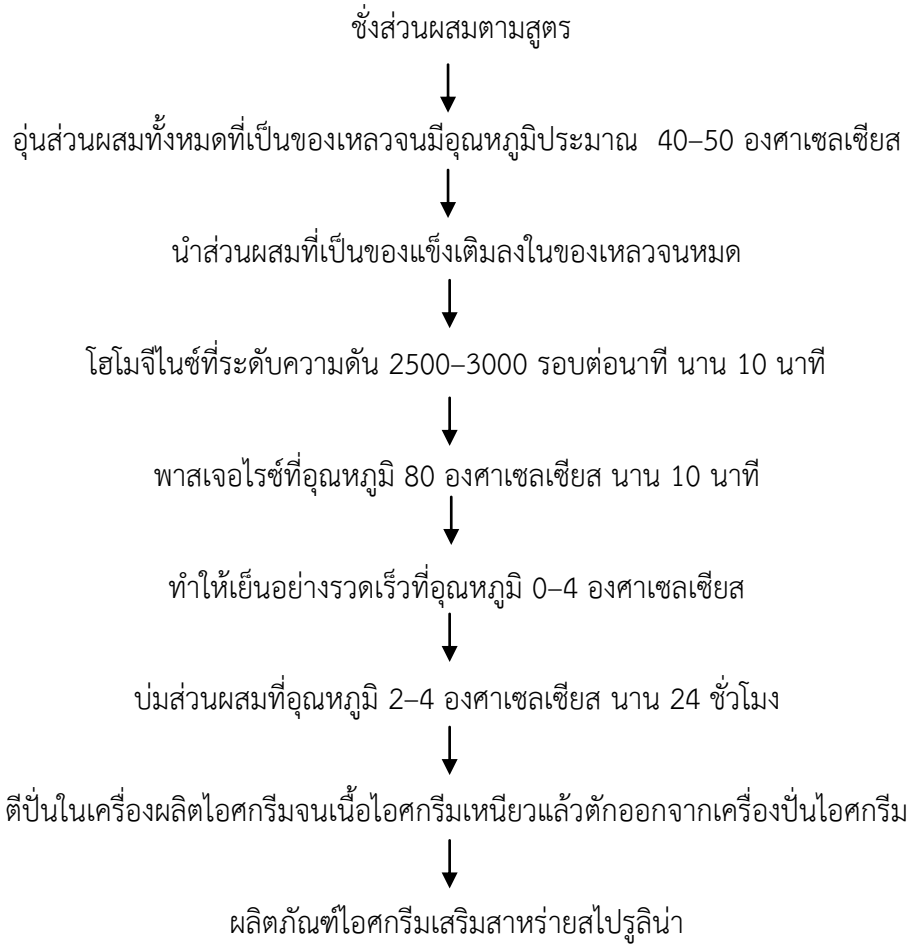
4.2.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์

4.2.3.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A)

4.2.3.2 จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B)

4.2.3.3 จำนวนโคลิฟอร์ม โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

4.2.3.4 จำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า (พัชรินทร์ รักถาวร, 2542)

4.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าสุดท้ายบรรจุลงถ้วยพลาสติกที่ปิดฝาสนิท แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -17 ถึง -21 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน สุ่มตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน มาวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A) จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B) จำนวนโคลิฟอร์ม โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002) และจำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

5.การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า

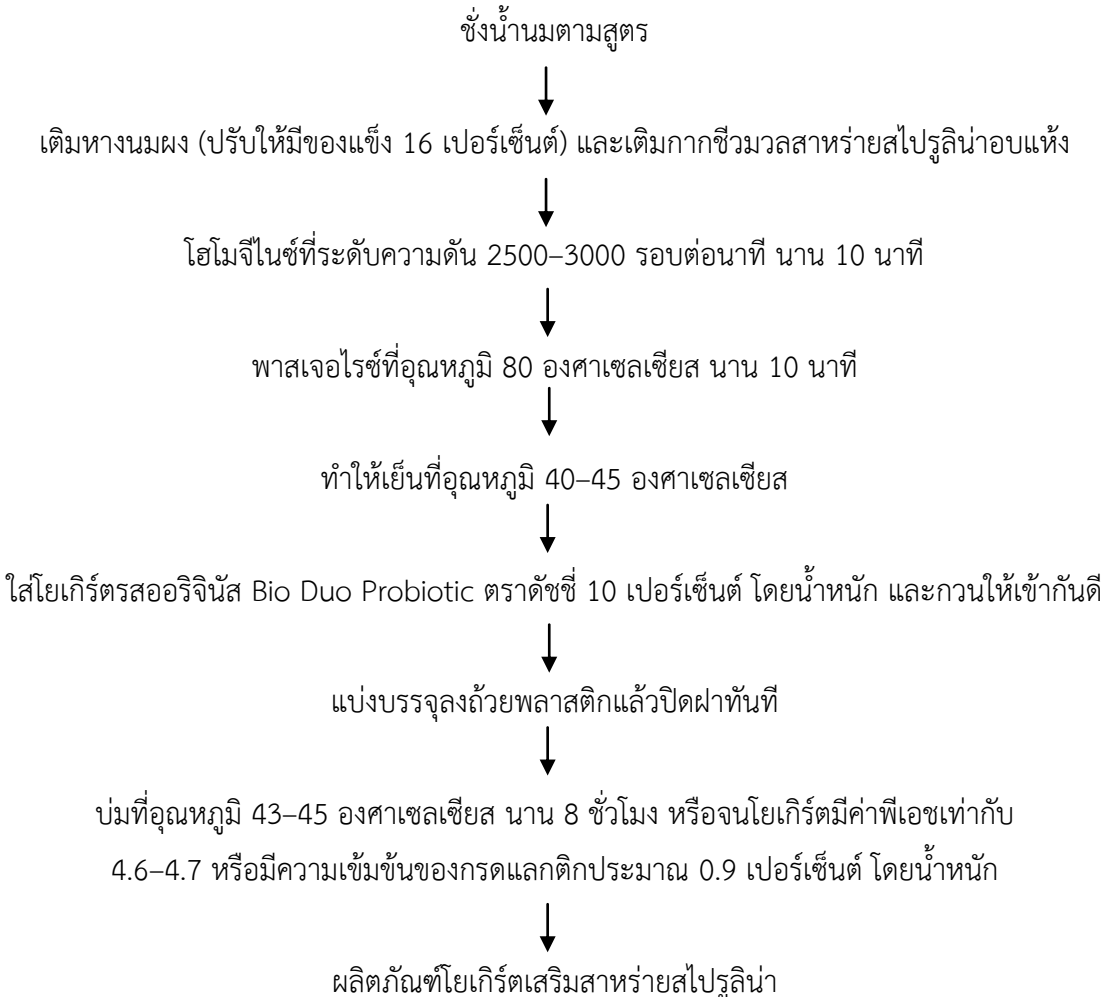
5.1 การศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งที่เหมาะสม

การทดลองนี้ใช้สูตรการผลิตโยเกิร์ตของ กุณฑลิยา ครุฑกะ (2544) เป็นสูตรมาตรฐานในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า ซึ่งประกอบด้วย น้ำนมและหางนมผง โดยผันแปรการเสริมกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งในการผลิตโยเกิร์ตแบบ Set yoghurt (การหมักเกิดขึ้นในบรรจุภัณฑ์ เนื้อโยเกิร์ตมีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว) 5 ระดับ ได้แก่ 0 0.25 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ได้สูตรทดลองทั้งหมด 5 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเทียบกับส่วนผสมของสูตรมาตรฐาน 100 กรัม ในการศึกษาปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เหมาะสม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)				
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
สูตรมาตรฐาน					
น้ำนม	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
หางนม	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
โยเกิร์ตรสออริจินัส	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Bio Duo Probiotic ตราดัชชี่					
กากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง	0.00	0.25	0.50	1.00	1.50

กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตแสดงดังภาพที่ 3.4 ในระหว่างการหมักสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 8 ชั่วโมง เพื่อมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ได้แก่ การเกิดเคิร์ด (Curd) การแยกตัวของน้ำบนผิวหน้า และกลิ่นรส ค่าพีเอช (โดยใช้เครื่อง pH meter) ปริมาณกรดแลกติก (AOAC, 2002) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก (ISO 15214, 1998) คัดเลือกปริมาณกากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้งที่เหมาะสม โดยนำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว ความหวานและความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scale ให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1–9 (9 = ชอบมากที่สุด, 1 = ชอบน้อยที่สุด)



ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า

ที่มา: กุณฑลิยา ครุฑกะ (2544)

5.2 การศึกษาปริมาณน้ำตาลทรายที่เหมาะสม

เตรียมส่วนผสมโยเกิร์ตตามสูตรที่คัดเลือกได้จากการศึกษาในขั้นต้น จากนั้นเติมน้ำตาลทรายในปริมาณแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0 3 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักก่อนการพาสเจอร์ไรส์ ได้สูตรในการทดลองทั้งหมด 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.4 ติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก และคัดเลือกปริมาณน้ำตาลทรายที่เหมาะสม โดยการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 5.1

ตารางที่ 3.4 ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเทียบกับส่วนผสมของสูตรมาตรฐาน 100 กรัม ในการศึกษาปริมาณน้ำตาลทรายที่เหมาะสม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
สูตรมาตรฐาน				
น้ำนม	90.00	90.00	90.00	90.00
หางนม	10.00	10.00	10.00	10.00
โยเกิร์ตรสออริจินัส	10.00	10.00	10.00	10.00
Bio Duo Probiotic ตราดัชชี่				
กากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง	0.50	0.50	0.50	0.50
น้ำตาลทราย	0.00	3.00	5.00	7.00

5.3 การศึกษาปริมาณเพกตินที่เหมาะสม

เตรียมส่วนผสมโยเกิร์ตตามสูตรที่คัดเลือกได้จากการศึกษาในขั้นต้น จากนั้นเติมเพกตินในปริมาณแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0 0.3 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักก่อนการพาสเจอร์ไรส์ ได้สูตรในการทดลองทั้งหมด 4 สูตร แสดงดังตารางที่ 3.5 โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก และคัดเลือกปริมาณเพกตินที่เหมาะสม โดยการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับข้อ 5.1

ตารางที่ 3.5 ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าเมื่อเทียบกับส่วนผสมของสูตรมาตรฐาน 100 กรัม ในการศึกษาปริมาณเพกตินที่เหมาะสม

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
สูตรมาตรฐาน				
น้ำนม	90.00	90.00	90.00	90.00
หางนม	10.00	10.00	10.00	10.00
โยเกิร์ตรสออริจินัส	10.00	10.00	10.00	10.00
Bio Duo Probiotic ตราดัชชี่				
กากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าอบแห้ง	0.50	0.50	0.50	0.50
น้ำตาลทราย	5.00	5.00	5.00	5.00
เพกติน	0.00	0.30	0.40	0.50

5.4 การวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าสุดท้าย

5.4.1 คุณภาพทางกายภาพ

5.4.1.1 วัดค่าสี L* a* b* โดยใช้เครื่อง Colorimeter ยี่ห้อ Hunter Lab Color Quest XE

5.4.1.2 ตรวจสอบค่าการแยกตัวของน้ำออกจากโยเกิร์ต (Syneresis) ตามวิธีการของ Tan and Korel (2007, pp. 342–356)

5.4.2 คุณภาพทางเคมี

5.4.2.1 ค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter

5.4.2.2 ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดแลกติก (AOAC, 2002)

5.4.2.3 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

5.4.2.4 ปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2002)

5.4.2.5 ปริมาณไขมัน (AOAC, 2002)

5.4.2.6 ปริมาณเส้นใยหยาบ (AOAC, 2002)

5.4.2.7 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2002)

5.4.2.8 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2002)

5.4.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์

5.4.3.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A)

5.4.3.2 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก (ISO 15214, 1998)

5.4.3.3 จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B)

5.4.3.4 จำนวน Coliforms โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

5.4.3.5 จำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002)

5.5 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าในระหว่างการเก็บรักษา

นำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่พัฒนาได้มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สุ่มตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน มาวิเคราะห์ค่าสี ค่าการแยกตัวของน้ำออกจากโยเกิร์ต ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2001A) จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก (ISO 15214, 1998) จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2001B) จำนวน Coliforms โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002) จำนวน *E. coli* โดยวิธีการหาค่า MPN (BAM, 2002) และทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบต่อคุณลักษณะต่าง ๆ การยอมรับโยเกิร์ตสไปรูลิน่าและข้อเสนอแนะต่าง ๆ

6. การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

นำผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันสุดท้ายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องหอมมะลิพองอัดแท่งเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า ผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า และผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า ไปทดสอบการยอมรับและทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านต่าง ๆ ด้วยวิธี Hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1–9 กับกลุ่มผู้บริโภค (Consumer) ที่รับประทานอาหารฟังก์ชันหรืออาหารเพื่อสุขภาพเป็นประจำจำนวน 120 คน จากนั้นสรุปผลความชอบในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันที่พัฒนาได้

7. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบทางกายภาพ เคมี ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอค (Randomized Completely Block Design, RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 23 วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Varience: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560–28 กุมภาพันธ์ 2562

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต