บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 ยีสต์ผงสำหรับทำไวน์ *Saccharomyces bayanus* ยี่ห้อ LALVIN EC 1118 SELECTION CHAMPENOISE

3.1.2 แบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* สายพันธุ์สำหรับผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.3 หัวเชื้อสำหรับผลิตวุ้นสวรรค์ *Acetobacter xylinum* จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.4 โยเกิร์ตรสธรรมชาติ ตราดัชชี่

3.2 วัตถุดิบ

3.2.1 แก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงเปลือกแดง (*Hylocereus polyrhizus* [(F.A.C.Weber) Britton and Rose]) จากสวนเกษตรกรจังหวัดสมุทรสาคร โดยเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2552

3.2.2 น้ำสับปะรดสเตอร์ริไรซ์ ตราทิปโก้

3.2.3 น้ำมะพร้าวแก่ จาก อำเภอ สวี จังหวัดชุมพร

3.2.4 นมผงขาดมันเนย ตราเอส-26 โปรมิล ผลิตโดยบริษัท ไวเอท นิวทริชั่นแนล สิงคโปร์

3.2.5 นมพร่องมันเนย ตราเมจิ ผลิตโดยบริษัท ซีพี เมจิ จำกัด ประเทศไทย

3.2.6 น้ำเชื่อมฟรุคโตส 55 % ตรา C บนใบไม้ จากบริษัท เจ้าคุณเกษตรพืชผล จำกัด

3.2.7 โยเกิร์ตรสธรรมชาติ ตราดัชชี่ ผลิตโดยบริษัท ดัชมิลล์ จำกัด

3.2.8 เพคตินประเภท rapid set บริษัทดี เค เบเกอรี่ จำกัด ประเทศไทย

3.2.9 น้ำตาลทราย ตรามิตรผล

3.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 กลูโคส (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.2 กรดซิตริก (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.3 กรดทาทาริก (MERCK/Merck KGaA/เยอรมัน)

3.3.4 กรดอะซิติกเข้มข้น 99.8 % (บริษัท วิทยาศรม จำกัด/ไทย)

3.3.5 ไดแอมโมเนียมฟอสเฟส (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.6 โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.7 DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) (MERCK/Merck KGaA/เยอรมัน)

3.3.8 แมกนีเซียมซัลเฟต (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.9 แอมโมเนียมซัลเฟต (ALSO REFER TO MSDS/ออสเตรเลีย)

3.3.10 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.11 เบนโทไนท์

3.3.12 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.13 แคลเซียมคาร์บอเนต (APS Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.14 โพแทสเซียมไฮโดรเจนพลาเลต (Ajax Finechem/ออสเตรเลีย)

3.3.15 ฟีนอล์ทาลีน (APS / Australia)

3.3.16 เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95%

3.3.17 กรดซัลฟูริก (H_2SO_2)

3.3.18 กรดไฮโดรคลอริก (HCI)

3.3.19 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether)

3.3.20 กรดบอริก (Boric Acid)

3.3.21 ออกทานอล (Octanal)

3.3.22 เมทธิวออเรนท์ (Mcthyl Orangc)

3.3.23 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) (MERCK/Merck KGaA / Germany)

3.3.24 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (MERCK/Merck KGaA/Germany)

3.3.25 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar (MERCK/Merck KGaA/Germany)

3.3.26 ยีสต์สกัด (MERCK/Merck KGaA/Germany)

3.3.27 สารละลาย NaCl 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ

3.3.28 น้ำกลั่น

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต

3.4.1.1 เครื่องแยกกาก Hydraulic machine turbo/Thai Sakaya®

3.4.1.2 เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (VAC-STAR รุ่น S220)

3.4.1.3 เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง

3.4.1.4 เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น A - 200s/Satorious)

3.4.1.5 หม้อนึ่งความดัน (HICLVE™/ ญี่ปุ่น)

3.4.1.6 ตู้แช่เยือกแข็ง sanyo

3.4.1.7 เครื่องโฮโมจิไนซ์ (Ultra-turrax/มาเลเซีย)

3.4.1.8 อุปกรณ์เครื่องครัว ได้แก่ มีด หม้อ ฯลฯ

3.4.1.9 ขวดแก้วใสขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง) 28 × 11 เซนติเมตร

3.4.1.10 ถาดแสตนเลสขนาด (กว้าง × ยาว × สูง) 14 × 19.5 × 10 เซนติเมตร

3.4.1.11 กระดาษขนาด A4

3.4.1.12 ยางรัด

3.4.1.13 จุกสำลี

3.4.1.14 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.4.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

3.4.2.1 เครื่องวัดค่าสี Handy Colorimeter NR-3000

3.4.2.2 เครื่องวัดเนื้อสัมผัส Texture analyzer

3.4.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

3.4.3.1 เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมด Hand refractometer (รุ่น N – 1 ATAGO/ญี่ปุ่น)

3.4.3.2 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV - 1601/Shimudzu/ญี่ปุ่น)

3.4.3.3 เครื่องวัดสี Handy Colorimeter (Nippon Denshoku (NR 3000 A)/ญี่ปุ่น)

3.4.3.4 เครื่องเซนตริฟิวส์ (รุ่น EBA 85/Hettich/ญี่ปุ่น)

3.4.3.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter รุ่น 3020 ยี่ห้อ JENWAY/ อังกฤษ)

3.4.3.6 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer/ฝรั่งเศส)

3.4.3.7 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.4.3.8 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Foss Analytical AB, Box 70 SE-26321 Hogans/ สวีเดน)

3.4.3.9 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Foss Analytical, Soxtec Avani/สวีเดน)

3.4.3.10 เครื่องวิเคราะห์เถ้า (Furnace 6010/สหรัฐอเมริกา)

3.4.3.11 ภาชนะหาความชื้น (Alumminium Can)

3.4.3.12 โถดูดความชื้น (Disicator)

3.4.3.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven memmet in Germany)

3.4.3.14 ชุด Titration

3.4.3.15 โถดูดความชื้น

3.4.3.16 เครื่องแก้วและฟลาสก์ขนาดต่างๆ

3.4.3.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น W760/MEMMERT/เยอรมนี)

3.4.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

3.4.4.1 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์อุณหภูมิ 43-45 °C (Mcmmert /BE 500/เยอรมัน)

3.4.4.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Erla/ ออสเตรเลีย)

3.4.4.3 หม้อนึ่งความดัน (HICLVE™/ ญี่ปุ่น)

3.4.4.4 เตาอบไมโครเวฟ (รุ่น Modle R-241/ SHARP/ ญี่ปุ่น)

3.4.4.5 เครื่องสั่นหลอดทดลอง (Scienctific Industries)

3.4.4.6 เครื่องตีป่นอาหาร(stomacher) และถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้กับ stomacher

3.4.4.7 อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ หลอดแก้ว บีกเกอร์ ปิเปต ฯลฯ

3.4.4.8 ช้อน หรือภาชนะตักอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.4.9 เข็มเขี่ยเชื้อ และลวดเขี่ยเชื้อ

3.4.4.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4.4.11 ปากคีบ

3.4.4.12 แอลกอฮอล์ 95 %

3.4.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.4.5.1 อุปกรณ์สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ถาด ถ้วย ช้อน แก้วน้ำ

3.4.5.2 แบบสอบถามการยอมรับของผู้บริโภค

3.4.5.3 ใบรายงานผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.4.6 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอายุการเก็บรักษา

3.4.6.1 ตู้เย็น Sharp รุ่น Superior อุณหภูมิ 5 ± 2 °C

3.4.7 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการประมวลผลข้อมูล

3.4.7.1 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.7.2 เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Personal computer)

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 รวบรวมข้อมูลและเก็บตัวอย่างผลแก้วมังกร

รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงเปลือกแดง(*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britt. & Rose) จากเอกสารงานวิจัยและสิ่งพิมพ์ต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลวิจัยต่อไป จากนั้นเก็บตัวอย่างผลสุกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงเปลือกแดงจากสวนเกษตรในจังหวัดสมุทรสาคร มายังห้องปฏิบัติการ

3.5.2 การเตรียมวัตถุดิบ

3.5.2.1 การเตรียมน้ำแก้วมังกร นำแก้วมังกรมาล้างน้ำให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง จากนั้นปอกเปลือกแยกส่วนเนื้อออกจากส่วนเปลือก นำเนื้อแก้วมังกรที่ได้ไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นแยกกาก กรองแยกกากที่เหลือด้วยผ้าขาวบางและนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็นแล้วบรรจุลงถุงพลาสติกปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึกสุญญากาศแล้วนำไปแช่เยือกแข็ง ส่วนเปลือกนำไปใส่ถุงพลาสติกและนำไปแช่เยือกแข็งเพื่อรอนำไปใช้ต่อไป

3.5.2.2 การเตรียมน้ำมะพร้าว นำน้ำมะพร้าวแก่จาก อำเภอสวี จังหวัดชุมพร มากรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปต้มเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายไขมันและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับน้ำมะพร้าว จากนั้นรอให้เย็นเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.5.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำแก้วมังกรและน้ำมะพร้าว

3.5.3.1 ค่าสี L* a* b* โดยเครื่องวัดสีระบบ CIE

3.5.3.2 ความใส (โดยนำไปเซนติฟิวจ์ที่ 3500 rpm และนำส่วนใสไปวัด % trancsmittance ที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank)

3.5.3.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer

3.5.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

3.5.3.4 ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดอะซิติก (Total titratable acidity)

3.5.3.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (DNS method) (Miller, 1959, pp, 426-428)

3.5.4 การผลิตไวน์แก้วมังกร

3.5.4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักไวน์แก้วมังกร

ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำแก้วมังกร : น้ำ (1:1 และ 1:2) เปลือกแก้วมังกร (0 และ 5 % (w/v)) และปริมาณ DAP (0 และ 0.2 % (w/v)) โดยวางแผนการ

ทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) และมีการจัดสิ่งทดลองแบบ 2^3 Factorial Design โดยมีรายละเอียดของแต่ละสิ่งทดลองดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การกำหนดปัจจัยในการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ในแผนการทดลองแบบ CRD ของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักไวน์แก้วมังกร

สิ่งทดลอง	ปัจจัยในการหมัก		
	น้ำแก้วมังกร : น้ำ	เปลือกแก้วมังกร % (w/v)	DAP % (w/v)
1	1:1	0	0
2	1:1	5	0
3	1:1	0	0.2
4	1:1	5	0.2
5	1:2	0	0
6	1:2	5	0
7	1:2	0	0.2
8	1:2	5	0.2

การเตรียมน้ำหมักโดยนำน้ำแก้วมังกรที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2.1 มาเจือจางด้วยน้ำตามอัตราส่วนที่ศึกษา จากนั้นปรับปริมาณกรดด้วยกรดซิตริกให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 % (w/v) และปรับความหวานเท่ากับ 22 °Brix ด้วยน้ำตาลทรายแล้วอ่านค่าความหวานด้วยเครื่อง Hand refractometer จากนั้นเติมเปลือกแก้วมังกรและ DAP ตามปริมาณที่ศึกษา เติม KMS 0.15 กรัมต่อกิโลกรัม ตวงน้ำหมักปริมาตร 2 ลิตร บรรจุลงขวดหมักปากแคบ (ปริมาตร 2.5 ลิตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแล้วปิดด้วยจุกสำลีชุบแอลกอฮอล์ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เติมยีสต์ผงในปริมาณ 0.025 % (w/v) เขย่าให้เชื้อยีสต์กระจายทั่วขวดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 12 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้ (ภาพที่ 12)

1) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ Hand refractometer

2) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (DNS method) (Miller, 1959, pp, 426-428)

3) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

4) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

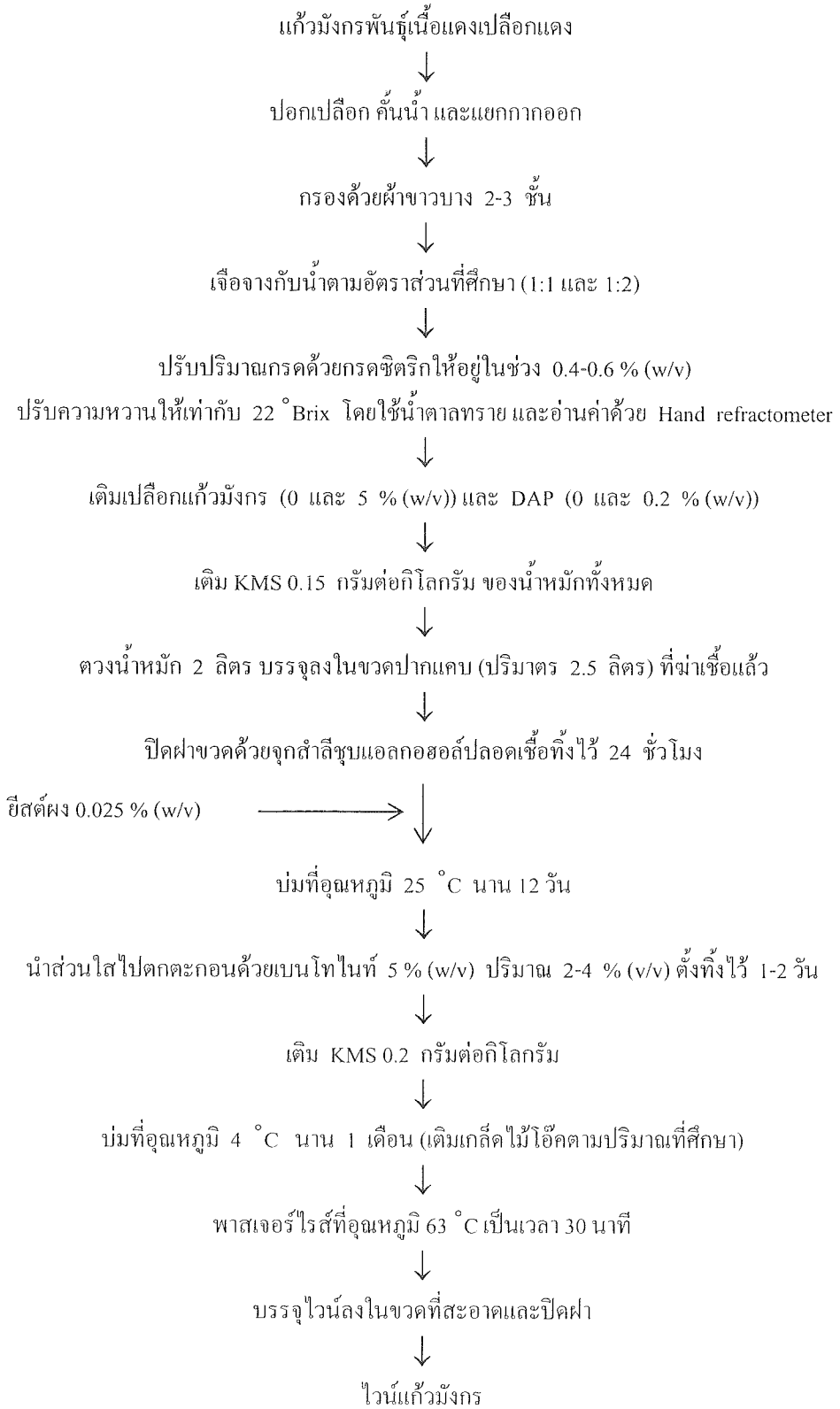
5) ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดซิตริก (Total Titratable Acidity) **(AOAC, 2000)**

3.5.4.2 การศึกษาผลของเกล็ดไม้โอ๊คต่อคุณภาพไวน์แก้วมังกรในระหว่างการบ่ม

คัดเลือกไวน์สูตรที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากลักษณะปรากฏ คุณภาพทางเคมีและอัตราการหมักมาศึกษาผลของเกล็ดไม้โอ๊คต่อคุณภาพของไวน์แก้วมังกร โดยหมักไวน์ตามสภาวะที่คัดเลือกเมื่อสิ้นสุดการหมักแยกส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเบนโทไนท์ความเข้ม 5 % (w/v) ในปริมาณ 2 % (v/v) ตั้งทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นแยกส่วนใสไปใส่ภาชนะใบใหม่แล้วเติม KMS 0.2 กรัมต่อกิโลกรัม นำไวน์ที่ได้เติมเกล็ดไม้โอ๊คในปริมาณ 0.2 และ 0.4 % (w/v) เปรียบเทียบกับสิ่งทดลองที่ไม่มีการเติมเกล็ดไม้โอ๊ค) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) นำไวน์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 เดือน ทุก 1 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างไวน์ไปวิเคราะห์คุณภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4.1

3.5.4.3 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำไวน์ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.5.4.2 มาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นบรรจุไวน์ลงในขวดแก้วสีเขียวมรกตที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดจุกและนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง นำไวน์ที่ได้มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสแบบ numerical scoring กับผู้ที่คุ้นเคยกับการดื่มไวน์จำนวน 5 คน



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการผลิตไวน์แก้วมังกร

ที่มา: ดัดแปลงจาก มณชัย เดชสังกรานนท์ อมรรัตน์ สีสุกอง และ สุวรรณา พิชัยยงค์วงศ์ดี (2549)

3.5.5 การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากไวน์แก้วมังกรโดยวิธีการหมักแบบถาด

3.5.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตคือ *Acetobacter pasteurianus* เนื่องจากสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงและใช้เวลาในการหมักสั้น การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มจากเติมน้ำสับปะรดลงในถาดแสตนเลสที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมไวน์แก้วมังกรที่ตกตะกอนแล้วลงไปโดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สุดท้ายเท่ากับ 6 % และปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของ *A. pasteurianus* ที่เลี้ยงในอาหาร GYEB อายุ 48 ชั่วโมง ลงไป 1 หลอด กวนผสมให้เชื้อกระจายโดยวิธีปลอดเชื้อ แล้วปิดด้วยพลาสติกใสเจาะรูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

3.5.5.2 การศึกษาผลของ DAP ต่อการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

การทดลองในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของ DAP ต่อการหมักหมักน้ำส้มสายชูจากไวน์แก้วมังกรโดยวิธีการหมักแบบถาด โดยใช้ไวน์แก้วมังกรที่ไม่ได้ผ่านการบ่มเป็นวัตถุดิบในการหมัก ศึกษาปริมาณ DAP 4 ระดับ คือ 0 0.1 0.3 และ 0.5 %(w/v) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) โดยเติมไวน์แก้วมังกรที่ไม่ได้ผ่านการบ่มลงไปในถาดกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 3.5.5.1 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม DAP ตามปริมาณที่ศึกษากวนให้เข้ากันดี แล้วปิดด้วยพลาสติกใสเจาะรูที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งปริมาณกรดคงที่ ในระหว่างการหมักสุ่มตัวอย่างน้ำหมักทุก 2 วัน และนำส่วนใสมาวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

1) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

2) ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดอะซิติก (Total titratable acidity) **(AOAC, 2000)**

3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

4) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer

3.5.5.3 การศึกษาปริมาณเบนโทไนท์ที่เหมาะสมในการทำให้น้ำส้มสายชูใส

การทดลองในขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเบนโทไนท์ที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารแขวนลอยที่มีอยู่ในน้ำส้มสายชูเพื่อให้น้ำส้มสายชูใส เนื่องจาก เบนโทไนท์มีความสามารถในการตกตะกอนสารต่างๆ ได้ดี อีกทั้งยังเป็นสารที่ไม่อันตราย มีราคาถูก วิธีปฏิบัติทำได้ง่ายและไม่มีผลรบกวนต่อกลิ่นรสของน้ำส้มสายชู โดยศึกษาการใช้สารละลายเบนโทไนท์ความเข้มข้น 5 % (w/v) ในปริมาณที่แตกต่างกัน 4 ระดับคือ 1 2 3 และ 4 % (v/v) เปรียบเทียบกับการไม่เติมเบนโทไนท์) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) หลังจากที่เติมเบนโทไนท์แล้วทำการเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วแยกส่วนใสออกจากตะกอน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพเปรียบเทียบกับก่อนทำให้ใส ดังนี้

1) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer

2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

3) ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดอะซิติก (Total Titratable Acidity) **(AOAC, 2000)**

4) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

5) ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (DNS method) (Miller, 1959, pp, 426-428)

6) วัดค่าความใส โดยการวัด % transmittance ที่ 660 nm ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

7) วัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี (colorimeter)

8) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL) **(AOAC, 2000)**

คัดเลือกปริมาณเบนโทไนท์ที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป จากนั้นนำส่วนใสของน้ำส้มสายชูมาพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 15 นาที และนำมากรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.5.5.4 การศึกษาการนำน้ำส้มสายชูหมักไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

นำน้ำส้มสายชูหมักที่พัฒนาได้ไปทดลองใช้กับผลิตภัณฑ์น้ำสลัดแบบข้นและแบบใส แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ไปทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ด้วยวิธี Hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1 - 9

3.5.6 การผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียเมื่อใช้น้ำแก้วมังกรเป็นวัตถุดิบ

3.5.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Acetobacter xylinum*

ดัดแปลงจาก บุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร (2546) และ สุเมธ ตันตระเธียร (2537) โดยถ่ายเชื้อ *A. xylinum* โคโลนี จากจานอาหารแข็งน้ำมะพร้าวลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเหลวน้ำมะพร้าวปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก2) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดทดสอบโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 % ลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.6.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้น้ำแก้วมังกรเป็นวัตถุดิบ 3 ปัจจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรีย ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำแก้วมังกรต่อน้ำมะพร้าว (5 : 5, 7 : 3 และ 9 : 1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (8 และ 10 °Brix) และความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (0, 0.5 และ 1.0 %(w/v)) โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) และมีการจัดสิ่งทดลองแบบ 3 × 2 × 3 Factorial design โดยมีรายละเอียดของการจัดสิ่งทดลองดังตารางที่ 12 โดยนำน้ำแก้วมังกรผสมกับน้ำ จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและปรับความหวานด้วยน้ำตาลทรายขาวตามสภาวะการทดลอง นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 99.8 % เติมหัวเชื้อ *A. xylinum* 10 % (v/v) แล้วบรรจุน้ำหมักที่ได้ลงในขวดแก้วใสขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง) 5 × 13 เซนติเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปิดฝาขวดด้วยกระดาษขาวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รัดด้วยยางรัดสะอาด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 °C นาน 7 วัน จากนั้นแผ่นวุ้นออกจากน้ำหมักแล้วนำไปวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

1) วัดความหนา

2) ชั่งน้ำหนักเปียก

3) วัดค่าสี L* a* b* โดยเครื่องวัดสีระบบ CIE

4) วัดปริมาณเซลลูโลส (บุญฤทธิ์ ฤทัยคงถาวร, 2546) และคำนวณหาอัตราการผลิตเซลลูโลส

ตารางที่ 12 การกำหนดปัจจัยในการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบ CRD ของการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยใช้น้ำแก้วมังกร

สิ่งทดลอง	ปัจจัยในการหมัก		
	น้ำแก้วมังกร : น้ำมะพร้าว	TSS (° Brix)	$(NH_4)_2SO_4$ %(w/v)
1	5 : 5	8	0
2	5 : 5	8	0.5
3	5 : 5	8	1.0
4	5 : 5	10	0
5	5 : 5	10	0.5
6	5 : 5	10	1.0
7	7 : 3	8	0
8	7 : 3	8	0.5
9	7 : 3	8	1.0
10	7 : 3	10	0
11	7 : 3	10	0.5
12	7 : 3	10	1.0
13	9 : 1	8	0
14	9 : 1	8	0.5
15	9 : 1	8	1.0
16	9 : 1	10	0
17	9 : 1	10	0.5
18	9 : 1	10	1.0

3.5.7 การผลิตโยเกิร์ตแก้วมังกร

3.5.7.1 การศึกษาปริมาณน้ำแก้วมังกรที่เหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ต

ดัดแปลงจากวิธีของ กุณฑลิยา ครุฑกะ (2544) และ นวลนภา อัคสินธังกูร (2546) โดยนำน้ำแก้วมังกรที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2.1 ไปผสมกับนมพาสเจอร์ไรส์เพื่อใช้การหมักโยเกิร์ตแบบคน (Stirred yogurt) ในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 5 10 15 20 และ 25 % โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) จากนั้นนำไปผสมกับนมผงพร่องมันเนยหรือนมผงขาดมันเนยให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมด 16 % นำไปโฮโมจีไนซ์และนำไปให้ความร้อนที่ 80 °C นาน 10 นาที ในอ่างน้ำร้อนทำให้เย็นที่ 40 - 45 °C ใส่หัวเชื้อโยเกิร์ต 5 % (w/v) กวนให้เข้ากันดีแล้วปิดฝาด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ทันที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43-45 °C จนโยเกิร์ตมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.6-4.7 หรือมีความเข้มข้นของกรดแลคติกประมาณ 0.9 % (วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต (2532); นวลนภา อัคสินธังกูร (2546)) ในระหว่างการหมักสุ่มตัวอย่างโยเกิร์ตมาติดตามการเปลี่ยนแปลงดังนี้

1) ตรวจสอบลักษณะปรากฏ เช่น การเกิดเคิร์ดการแยกตัวของน้ำบนผิวหน้า และกลิ่นรส

2) ค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่อง pH meter

3) ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดแลคติก (AOAC, 2000)

4) จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (AOAC, 2000)

5) การทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยกวนโยเกิร์ตให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว และความชอบรวม โดยผู้ทดสอบทั่วไปจำนวน 50 คน ด้วยวิธี 9-point Hedonic Scale ให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1–9 (9 = ชอบมากที่สุด, 1 = ชอบน้อยที่สุด)

3.5.7.2 การศึกษาปริมาณฟรุคโตสไซรัปที่เหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ตแก้วมังกร

เตรียมส่วนผสมโยเกิร์ตตามสูตรที่คัดเลือกได้จากการศึกษาในขั้นต้น จากนั้นเติมฟรุคโตสไซรัปในปริมาณแตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0 5 7 และ 9 % (w/v) ก่อนการพาส

เจอร์ไรส์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด(Completely randomized design, CRD) ระหว่างการหมักติดตามการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับข้อ 3.5.7.1

3.5.7.3 การศึกษาปริมาณเพคตินที่เหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ตแก้วมังกร

เตรียมโยเกิร์ตตามสูตรที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.5.7.1 และเติมฟรุคโตสไซรัปตามปริมาณที่เหมาะสมในข้อ 3.5.7.2 มาเติมเพกตินในปริมาณที่แตกต่างกัน 4 ระดับคือ 0 0.4 0.45 และ 0.5 % (w/v) ก่อนการพาสเจอร์ไรส์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) ติดตามการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับข้อ 3.5.7.1

3.5.7.4 การตรวจสอบคุณภาพโยเกิร์ตแก้วมังกร

1) การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

(1) ตรวจสอบลักษณะปรากฏ เช่น การเกิดเคิร์ด การแยกตัวของน้ำบนผิวหน้า และกลิ่นรส

(2) วัดค่าสี L* a* b* โดยใช้ Colorimeter

(3) ตรวจสอบค่า syneresis (จงกลณี แววหงษ์, 2540)

2) การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

(1) ความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter

(2) ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดแลคติก (AOAC, 2000)

(3) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solid, TS) (AOAC, 2000)

(4) ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

(5) ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

(6) ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

(7) ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

3) การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

(1) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2000)

(2) จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (AOAC, 2000)

(3) จำนวนยีสต์/รา (AOAC, 2000)

3.5.7.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพโยเกิร์ตแก้วมังกรในระหว่างการเก็บรักษา

นำโยเกิร์ตที่พัฒนาได้มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 2 °C แล้วสุ่มตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน จนครบ 10 วันหรือจนกว่าโยเกิร์ตจะเสื่อมเสียมาตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมดคำนวณในรูปของกรดแลคติก (%) ค่าสี ค่า syneresis จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวนยีสต์/รา และทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบต่อคุณลักษณะต่างๆ การยอมรับโยเกิร์ตแก้วมังกรและข้อเสนอแนะต่าง ๆ

3.5.7.6 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

นำโยเกิร์ตที่พัฒนาได้ไปทดสอบการยอมรับและทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความหวาน และความชอบโดยรวม ด้วยวิธี Hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบที่ระดับ 1-9 กับกลุ่มผู้บริโภคทั่วไป (consumer) จำนวน 120 คน อายุ 18-25 ปี สรุปผลความชอบในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตแก้วมังกร

3.5.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบทางกายภาพ เคมี ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดในบลอคโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอค (Randomized Completely Block Design, RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป วิเคราะห์ความแปรปรวน(Analysis of Varience: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.6 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระยะเวลา 1 ปี ใช้งบประมาณปี 2552 ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 – 30 กันยายน 2552

3.7 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร ห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร และห้องปฏิบัติการการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต