บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. แก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาว ซื้อจากตลาดใหม่ ต.บางทราย อ.เมือง จ.ชลบุรี
2. ครีม (ปริมาณไขมัน 35%) ตราโฟร์โมสต์ บริษัทฟรีสแลนด์ ฟู้ดส์ โฟร์โมสต์ จำกัด (มหาชน)
3. น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล บริษัทมิตรผล จำกัด
4. สารเพิ่มความคงตัว (Stabilizer) Fulfill I 400 บริษัท บอร์เนต คอร์เปอเรชั่น จำกัด
5. หางนมผง (Skimmed milk powder; SMP) บริษัทเอฟ เอ กรุ๊ป จำกัด (มหาชน)
6. ไฮเมซ รีซิซแตนท์ สตาร์ช (Hi-maize resistance starch) บริษัทเนชั่นแนล สตาร์ช แอนด์ เคมีคัล ไทยแลนด์ จำกัด
7. น้ำมันถั่วเหลือง ตรากุ๊ก บริษัทธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

สารเคมี

1. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride, $CaCl_2$, AR grade, Ajax Finechem, Australia)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, Nacl, AR grade, Ajax Finechem, Australia)
3. โซเดียมอัลจิเนต (Sodium Alginate, $C_6H_7NaO_6$, AR grade, Fluka, Switzerland)
4. โพลีออกซีเอททิลลีนซอบิเทนโมโนโอลีเอต (Tween 80, $C_{64}H_{124}O_{26}$, AR grade, BCH, U.S.A.)
5. ฟอสเฟต บัฟเฟอร์(Phosphate buffer, AR grade, Ajax Finechem, Australia)
6. เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH, AR grade, Carlo Erba Reagenti, Italy)

เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 372 อยู่ในลักษณะผงแห้งจากการทำแห้งแบบแช่เข็งระเหิด จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จังหวัดปทุมธานี
2. DeMan-Rogosa-Sharpe Broth (AR grade, HiMedia, Germany)
3. Plate count agar (PCA, AR grade, Merck Darmstadt, Germany)
4. Peptone water (PDA, AR grade, Merck Darmstadt, Germany)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (AC 211S, Sartorius, Germany)
2. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดหยาบ (BA 610, Sartorius, Germany)
3. เครื่องปั่นผสม (HGBTWT, Worring Commercial, U.S.A.)
4. เครื่องปั่นไอศกรีม (HOM 122050, RIVAL, Thailand)
5. เครื่องระเหยน้ำแบบสุญญากาศ (SE 320, Labo Rota, Switzerland)
6. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (120 E 101, Plus, U.S.A.)
7. เครื่องวัดความหนืด (DV 3, Brookfield, U.S.A.)
8. เครื่องวัดสี (Miniscan XE plus, Hunter lab, U.S.A.)
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Z326K, Hermle, Germany)
10. ตู้แช่เยือกแข็ง (Sanyo, Thailand)
11. ตู้อบลมร้อน (ULE 600, Memment, Germany)
12. ตะแกรงสแตนเลส ขนาดรูตะแกรง 10 รูต่อตารางนิ้ว
12. ถ้วยพลาสติกสำหรับบรรจุไอศกรีม ขนาด 3 ออนซ์
13. โถดูดความชื้น (Dissicator)
14. อุปกรณ์เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (Crucible) อลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (Moisture can) บีกเกอร์
15. อุปกรณ์งานครัว ได้แก่ มีด เขียง จาน กาละมัง หม้อ ช้อน ทัพพี
16. อุปกรณ์ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ถ้วยชิม แก้วน้ำ จาน และ, ช้อน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดและวิเคราะห์คุณภาพผงโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

1.1 การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

สกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรโดย ดัดแปลงจากสันทัด วิเชียรโชติ และมาริสา จาตุพรพิพัฒน์ (2553) มีขั้นตอนดังนี้ นำแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวมาปอกเปลือกเอาแต่เนื้อหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1x1ซม^3. ใส่ลงในภาชนะ เติมน้ำกลั่นลงไปในอัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 (w/w) บีบผสมให้เข้ากันแล้วกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเมล็ดออกเติมเอทานอล 95% ลงไปในน้ำเมือกที่กรองได้ในอัตราส่วน1:1 (w/w) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 22 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นสาร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แขวนลอยที่มีแผ่นฟิล์มบาง ๆ ลอยอยู่ที่ผิว กรองผ่านตะแกรงเพื่อแยกส่วนแผ่นฟิล์ม นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาระเหยเอทานอลโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 70 °C จากนั้นเติมน้ำลงไปในอัตราส่วน 1:1 (w/w) ระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิประมาณ 90 °C จนได้สารละลายที่ข้นและไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ ถ้ายังมีกลิ่นแอลกอฮอล์อยู่ให้เติมน้ำลงไปอีกในอัตราส่วน 1:1 (w/w) แล้วระเหยน้ำออก จากนั้นทำให้แห้งด้วยการทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิด (Freeze dried) ให้มีความชื้นไม่เกิน 5 % ขั้นตอนการสกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรแสดงดังแผนภาพที่ 3-1

เนื้อแก้วมังกร + น้ำกลั่น 1:1 (w/w)

↓

บีบผสมให้เข้ากัน

↓

กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเมล็ดออก

↓

น้ำเมือกที่กรองได้ + เอธานอล 95% 1:1 (w/w)

↓

แช่แข็งที่ -20 ºC นาน 22 ± 2 ชม.

↓

กรองเอาแผ่นฟิล์มที่ลอยอยู่บนผิว

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C

↓

เติมน้ำลงไป อัตราส่วน 1:1 (w/w)

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C

↓

ได้ตัวอย่างที่ข้นและไม่มีกลิ่นแอลกอฮอล์

(ถ้ายังมีกลิ่นแอลกอฮอล์อยู่ให้เติมน้ำลงไปอีกในอัตราส่วน 1:1 (w/w) แล้วระเหยน้ำออก)

↓

ทำแห้งแบบแช่แข็งระเหิด (ให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นไม่เกิน 5 %)

↓

ผงโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และทางเคมี ของผงโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ ดังนี้

1.2.1 ค่าความหนืดของสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เครื่องวัดค่าความหนืด ดัดแปลงจากวิธีของวิภาวี ศรีคำภา (2551) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 1

1.2.2 ดัชนีการละลายน้ำ (Water soluble index) และดัชนีการดูดซับน้ำ (Water absorption index) ดัดแปลงจากวิธีของ Anderson et al. (1969) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 2

1.2.3 ค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี รายงานเป็นค่า L* a* และ b* รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 3

1.2.4 ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AACC (1994) 44-19 รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข ข้อ 1

2. การพัฒนาสูตรไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์

2.1 การผลิตไอศกรีมนมสูตรพื้นฐาน

ผลิตไอศกรีมนมโดย ดัดแปลงจาก สมจิตร สุรพัฒน์ (2544) และ BENEO-Orafti (2552) มีขั้นตอนดังนี้ ชั่งส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตไอศกรีมนมสูตรพื้นฐานตามสัดส่วนที่กำหนดในตารางที่ 3-1 ให้มีปริมาณรวม 1,000 กรัม ผสมส่วนผสมของแห้งทั้งหมดเข้าด้วยกัน และนำไปละลายผสมกับน้ำ เติมส่วนครีม และกลิ่นรส นำไปให้ความร้อนจนอุณหภูมิถึง 55 °C และคงไว้เป็นเวลา 30 วินาที ตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 2 นาที นำไปพาสเจอร์ไรส์โดยให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้ส่วนผสมทั้งหมดมีอุณหภูมิ 85 °C นาน 2 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ภาชนะลงในอ่างน้ำเย็นจนอุณหภูมิส่วนผสมลดลง แล้วนำไปบ่มโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เป็นส่วนผสมของไอศกรีมเหลว นำไปปั่นในเครื่องปั่นไอศกรีมจนกระทั่งไอศกรีมเหลวขึ้นฟูทั้งหมด แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขั้นตอนการผลิตไอศกรีมนมสูตรพื้นฐานแสดงดังภาพที่ 3-2 นำไอศกรีมเหลวก่อนการแช่แข็งและไอศกรีมที่ผลิตได้จากสูตรพื้นฐานมาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัส เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเปรียบเทียบคุณภาพไอศกรีมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 ส่วนผสมไอศกรีมนมสูตรพื้นฐาน

ส่วนผสม	% (w/w)
ครีม	25.60
หางนมผง	10.20
น้ำตาลทราย	12.00
สารเพิ่มความคงตัว	0.80
น้ำ	51.40

2.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสของไอศกรีม

นำไอศกรีมเหลวและไอศกรีมที่ผลิตได้มาวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสของไอศกรีม ดังนี้

2.2.1 ค่าความหนืดของไอศกรีมเหลวก่อนการแช่แข็ง โดยใช้เครื่องวัดความหนืดดัดแปลงจากวิธีของ Chang et al. (1995) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 4

2.2.2 ค่าสีของไอศกรีม โดยใช้เครื่องวัดสี รายงานเป็นค่า L* a* และ b* รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 5

2.2.3 เวลาที่ใช้ในการขึ้นฟูและค่าการขึ้นฟู (Over run) ตามวิธีของ Marshall and Arbuckle (1996) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 6

2.2.4 อัตราการละลาย ดัดแปลงจากวิธีของ Koxholt et al. (2001) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก ข้อ 7

2.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ AOAC (2005) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข ข้อ 2

2.2.6 ความชอบด้านสี กลิ่น รสหวาน เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยวิธี 9-point hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบ จำนวน 30 คน แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก ค

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนในการผลิตไอศกรีมนมสูตรพื้นฐาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3 การกลั่นกรองปัจจัยด้านปริมาณส่วนผสมที่มีความสำคัญต่อคุณภาพไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

ในการพัฒนาสูตรไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ ดำเนินการโดยการนำไอศกรีมนมสูตรพื้นฐานมาปรับใช้ โดยมีความมุ่งหมายที่จะเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากแก้วมังกรเข้าไปในสูตร จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า การเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณมากเกินไปมีผลกระทบต่อคุณภาพทางกายภาพของไอศกรีมเหลว โดยทำให้ไอศกรีมเหลวมีค่าความหนืดสูงจนไม่สามารถขึ้นฟูเป็นไอศกรีมได้ ทั้งนี้พบว่า ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถเติมลงในไอศกรีมได้มากที่สุดคือ 6% w/w โดยไอศกรีมเหลวยังสามารถขึ้นฟูเป็นไอศกรีมได้ และปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถเติมลงในไอศกรีมคือ 2% w/w อย่างไรก็ตามการเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ เข้าไปในสูตรมีผลกระทบต่อคุณภาพของไอศกรีม

ขั้นตอนนี้เป็นการกลั่นกรองปัจจัยด้านปริมาณส่วนผสมที่มีความสำคัญหรือมีผลกระทบต่อคุณภาพของไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ โดยการออกแบบการทดลองแบบ Plackett and Burman ปัจจัยที่กลั่นกรองคือ ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณสารเพิ่มความคงตัว ปริมาณน้ำตาล ปริมาณครีม และ ปริมาณหางนมผง โดยกำหนดช่วงของแต่ละปัจจัยดังตารางที่ 3-2 แผนการทดลองเป็นแบบ N = 8 ซึ่งจะทำให้กลั่นกรองปัจจัยได้ทั้งหมด 5 ตัว ที่เหลืออีก 2 ตัวจะเป็น Dummy variables รายละเอียดแผนการทดลองที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3-3 เตรียมส่วนผสมไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์สูตรพื้นฐานและตามแผนการทดลองที่กำหนดได้โดยเติมน้ำลงไปในแต่ละสูตรให้ครบ 100%ส่วนผสมไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 8 สิ่งทดลองแสดงดังตารางที่ 3-4 ผลิตไอศกรีมและวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และประสาทสัมผัสตามข้อ 2.2

ตารางที่ 3-2 การกำหนดปริมาณส่วนผสมที่ใช้ในระดับต่ำและระดับสูงของปัจจัยที่กลั่นกรองแบบ Plackett and Burman

ปัจจัย	เปอร์เซ็นต์ (w/w)	
	ระดับต่ำ (-)	ระดับสูง (+)
X_1 : ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์	2.0	6.0
X_2 : ปริมาณสารเพิ่มความคงตัว	0.20	0.80
X_3 : ปริมาณน้ำตาลทรายขาว	8.00	12.0
X_4 : ปริมาณครีม	20.0	30.0
X_5 : ปริมาณหางนมผง	8.0	12.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-3 แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman (N=8) ที่เลือกใช้

สิ่งทดลองที่	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ X_1 - X_7 หมายถึงปัจจัยที่ศึกษาตามแผน N = 8

เครื่องหมาย + หมายถึงการใช้ปัจจัยระดับสูง

เครื่องหมาย – หมายถึงการใช้ปัจจัยระดับต่ำ

ตารางที่ 3-4 ส่วนผสมไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรทั้ง 8 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลองที่	โอลิโกแซคคาไรด์	สารเพิ่มความคงตัว	น้ำตาลทรายขาว	ครีม	หางนมผง
1	6.0	0.8	12.0	20.0	12.0
2	6.0	0.8	8.0	30.0	8.0
3	6.0	0.2	12.0	20.0	8.0
4	2.0	0.8	8.0	20.0	12.0
5	6.0	0.2	8.0	30.0	12.0
6	2.0	0.2	12.0	30.0	12.0
7	2.0	0.8	12.0	30.0	8.0
8	2.0	0.2	8.0	20.0	8.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นำค่าคุณภาพที่ได้มาวิเคราะห์ผลและสรุปผล โดยดำเนินการดังนี้

1. คำนวณค่าผลของปัจจัย (Effect; E)

จากสูตร $Ex_1\text{-}x_7 = \frac{R\ at\ (+)}{4} - \frac{R\ at\ (-)}{4}$

เมื่อ $Ex_1\text{-}x_7$ = ผลของปัจจัย $X_1\ X_2\ X_3\ X_4\ X_5\ X_6$ และ X_7

R at (+) = ค่าคุณภาพที่เกิดขึ้นจากการใช้ปัจจัยนั้นในระดับสูง

R at (-) = ค่าคุณภาพที่เกิดขึ้นจากการใช้ปัจจัยนั้นในระดับต่ำ

2. คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error; S.E.)

จากสูตร $S.E. = \sqrt{V_{eff}}$

โดยที่ $V_{ef} = \frac{\sum (E_d^{\ 2})}{n}$

เมื่อ E_d = Dummy effect

n = จำนวนของ Dummy effect

3. คำนวณค่า t

จากสูตร $t = \frac{Ex_1\text{-}x_5}{S.E.}$

เมื่อ $Ex_1\text{-}x_5$ = ผลของปัจจัย $X_1\ X_2\ X_3\ X_4$ และ X_5

S.E. = ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

4. การสรุปผล

นำค่า t จากการคำนวณไปเปรียบเทียบกับค่า t ตาราง ที่ระดับความเชื่อมั่น 90% โดยเปิดตาราง t ที่ Degree of freedom เท่ากับจำนวนของ Dummy variables โดยมีเกณฑ์ในการตัดสินคือ

ถ้า ค่า t คำนวณ น้อยกว่า ค่า t ตาราง แสดงว่า ปัจจัยนั้นไม่มีผลต่อระบบที่ระดับความเชื่อมั่น 90%

ถ้า ค่า t คำนวณ มากกว่า ค่า t ตาราง แสดงว่า ปัจจัยนั้นมีผลต่อระบบที่ระดับความเชื่อมั่น 90%

2.4 การสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณส่วนผสมกับค่าคุณภาพไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร

นำปัจจัยด้านปริมาณส่วนผสมที่กลั่นกรองได้ว่ามีความสำคัญที่สุดจำนวน 3 ปัจจัย (X_1, X_2, X_3) ต่อคุณภาพไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 2.3 มาจัดสิ่งทดลองแบบ CCD (Central composite design) แบบหุ่นกำลังสอง ตามมาตรฐาน Octagon รูปแบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผนการทดลองแสดงดังตารางที่ 3-5 เตรียมส่วนผสมไอศกรีมตามแผนการทดลองที่กำหนด ผลิตไอศกรีมตามวิธีข้อ 2.1 โดยกำหนดเวลาในการปั่นไอศกรีมเท่ากันทุกสูตรแล้ววิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมีและประสาทสัมผัส ตามข้อ 2.2 สร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณส่วนผสมกับค่าคุณภาพที่วัดได้ โดยวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุ (Multiple regressions) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13 โดยมีความสัมพันธ์ดังนี้

$$Y = \int X_1, X_2, X_3$$

เมื่อ Y = คุณภาพของไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์

X_1, X_2, X_3 = ปัจจัยด้านปริมาณส่วนผสมของ X_1, X_2 และ X_3

ทั้งนี้พิจารณาความน่าเชื่อถือของสมการจากค่า R^2 (Coefficient of determination) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า สมการมีความเหมาะสม และพิจารณาจากค่า Model Significance ซึ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างค่า Y และ X ถ้ามีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงถึงค่า Yและ X มีความสัมพันธ์กันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

นำสมการที่น่าเชื่อถือมาสร้างกราฟพื้นผิวการตอบสนอง โดยวิธี Response surface methodology (RSM) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistica version 5.0 เพื่อพิจารณาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้านปริมาณส่วนผสมที่ศึกษากับคุณภาพของไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์

2.5 การคัดเลือกสูตรไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ที่เหมาะสมและการทวนสอบผลจากการทำนาย

2.5.1 การคัดเลือกสูตรไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ที่เหมาะสม

คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมจากกราฟพื้นผิวการตอบสนอง (RSM) ที่ได้จากข้อ 2.4 โดยเลือกพื้นที่ที่ทำให้ไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าคุณภาพต่าง ๆ ใกล้เคียงกับไอศกรีมนมสูตรพื้นฐาน และได้รับคะแนนความชอบจากการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสสูง (ควรได้รับคะแนนความชอบมากกว่า 6 คะแนน จาก 9 คะแนน) เลือกตำแหน่งที่มีการใช้ส่วนผสมระดับต่าง ๆ จากกราฟ RSM นำไปผลิตไอศกรีมและวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมีและประสาทสัมผัสต่าง ๆ เหมือนกับข้อ 2.2 โดยเปรียบเทียบคุณภาพกับไอศกรีมนมสูตรพื้นฐาน แล้วเลือกไอศกรีมสูตรที่ได้มีคุณภาพใกล้เคียงกับไอศกรีมนมสูตรพื้นฐานมากที่สุดและได้รับคะแนนความชอบโดยรวมสูงที่สุด

การวิเคราะห์ทางสถิติ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13

ตารางที่ 3-5 รูปแบบมาตรฐานการจัดสิ่งทดลองแบบ CCD แบบหุ่นกำลังสอง ตามมาตรฐาน Octagon เมื่อมีปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย (X_1 X_2 และ X_3)

สิ่งทดลองที่	ค่ารหัส		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

2.5.2 การทวนสอบผลจากการทำนาย

ดำเนินการทวนสอบผลจากการทำนาย โดยการผลิตไอศกรีมตามสูตรคัดเลือกในข้อ 2.5.1นำมาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม โดยวิธี 9 point hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก ค ผลที่ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คือค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง (Y_{ex}) แทนค่าปริมาณส่วนผสมที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 2.5.1 ในสมการที่ใช้ทำนาย ผลที่ได้คือค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย (Y_{pred}) คำนวณค่า Root mean square ซึ่งบ่งบอกความคลาดเคลื่อนของการทำนายจากการใช้สมการ การคำนวณค่า Root mean square ได้จากสูตร

$$\text{Root mean square} = 100\sqrt{\frac{\sum[(Y_{ex} - Y_{pred})/Y_{pred}]^2}{N}}$$

เมื่อ Y_{ex} = ค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง

Y_{pred} = ค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย

N = จำนวนข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ถ้ามีค่า Root mean square ต่ำกว่า 20% แสดงว่า ค่าที่ได้จากการทำนายมีความคลาดเคลื่อนจากค่าจริงน้อย (Julian, 2004) สามารถสรุปได้ว่า สมการที่ใช้ทำนายมีความคลาดเคลื่อนต่ำ มีความน่าเชื่อถือในการนำสมการไปใช้ที่เหมาะสมที่สามารถผลิตได้จริง

3. การศึกษาวิธีการเติมโพรไบโอติกในไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์

เชื้อโพรไบโอติกที่เลือกใช้คือ *Lactobacillus rhamnosus* TISTR 372 เนื่องจาก มีรายงานว่าสามารถทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร และน้ำดีได้ เมื่อเติมลงในไอศกรีม พบว่า ไม่มีผลต่อค่าการขึ้นฟู และอัตราการละลายของไอศกรีม (Christina et al., 2005) ทั้งนี้ในการเติมโพรไบโอติกในอาหารควรมีปริมาณโพรไบโอติกอย่างน้อย 10^5-10^6 cfu/g ของอาหาร จึงให้ผลดีต่อสุขภาพ (Dave & Shah, 1997) ความมุ่งหมายสำหรับการทดลองนี้คือ การเติมเชื้อโพรไบโอติก ในไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์ที่เลือกได้ โดยให้มีอัตราการเหลือรอดของจุลินทรีย์ในไอศกรีมอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการหาวิธีการเติมไบโอติกที่เหมาะสม โดยปรับปรุงการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ แปรวิธีการเตรียมโพรไบโอติกก่อนเติมลงในไอศกรีม 2 วิธี ได้แก่ การเลี้ยงโพรไบโอติกในอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) และการเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.1 การเตรียมโพรไบโอติก *L. rhamnosus* TISTR 372

นำโพรไบโอติก *L.rhamnosus* TISTR 372 ที่อยู่ในลักษณะผงแห้งจากการทำแห้งแบบแช่เข็งระเหิดมาเตรียมก่อนเติมลงในไอศกรีม 2 วิธี ดังนี้

3.1.1 การเลี้ยงโพรไบโอติกในอาหาร MRS (Christina et al., 2005)

นำโพรไบโอติก *L. rhamnosus* TISTR 372 ที่อยู่ในลักษณะผงแห้งมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (MRS Broth) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS (MRS Agar) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว MRS อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ± 1 ชั่วโมง แยกเซลล์โพรไบโอติกโดยนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย Phosphate buffer 2 ครั้ง ทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยการเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยให้เทียบเท่ากับการมีปริมาณเโพรไบโอติก $10^8 - 10^9$ cfu/ml โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กับค่าการดูดกลืนแสง รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ง ข้อ 1 เมื่อปรับความขุ่นได้ตามต้องการแล้ว แยกเซลล์โพรไบโอติก โดยนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C รินสารละลายส่วนใสทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนเซลล์สำหรับนำไปเติมในไอศกรีมทั้งนี้คำนวณปริมาณโพรไบโอติกที่ต้องใช้เติมในไอศกรีม โดยกำหนดให้มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกประมาณ 10^8-10^9 cfu/g ของไอศกรีม

3.1.2 การเคลือบเซลล์โพรไบโอติกด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชันก่อนเติมลงในไอศกรีม (Sheu & Marshall, 1993)

ดำเนินการเตรียมโพรไบโอติก *L. rhamnosus* TISTR 372 จนได้สารแขวนลอยของเชื้อเทียบเท่ากับการมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกอยู่ในช่วง $10^8 - 10^9$ cfu/g ตามวิธีในข้อ 3.1.1 รินสารละลายส่วนใสทิ้งแล้ว เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml ลงไปในเซลล์ นำสารแขวนลอยของเซลล์ที่ได้มาเคลือบเซลล์ด้วยวิธีไมโครเอนแคปซูเลชัน ดำเนินการโดยนำสารแขวนลอยเติมลงในสารละลายผสมของโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% w/v และ Hi-maize resistance starch ความเข้มข้น 2% w/v เติมน้ำมันถั่วเหลืองที่มี Tween 80 ความเข้มข้น 0.02% w/v ลงไปปริมาณ 100 ml คนอย่างรวดเร็ว แล้วเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 250 ml คนจนเกิดเป็นเม็ดอัลจิเนตสีขาว เป็นเม็ดขนาดเล็กซึ่งห่อหุ้มเซลล์ไว้ ทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เม็ดอัลจิเนตตกลงมาด้านล่าง รินชั้นของน้ำมันทิ้ง นำสารแขวนลอยที่ได้มาแยกเม็ดอัลจิเนต โดยปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้ว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ล้างเม็ดอัลจิเนต 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 % w/v นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะเม็ดอัลจิเนตที่เคลือบเซลล์อยู่ สำหรับนำไปเติมในไอศกรีมทั้งนี้คำนวณปริมาณโพรไบโอติกที่ต้องใช้เติมในไอศกรีม โดยกำหนดให้มีโพรไบโอติกประมาณ 10^8-10^9 cfu/g ของไอศกรีม

3.2 การศึกษาการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในไอศกรีมหลังการแช่แข็งและระหว่างการเก็บรักษา

เติมโพรไบโอติกที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 3.1 ลงในไอศกรีมเหลวตามสูตรที่เลือกได้ กำหนดให้มีโพรไบโอติกประมาณ 10^8-10^9 cfu/g แล้วนำมาปั่นในเครื่องปั่นไอศกรีม แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกเริ่มต้นซึ่งเป็นปริมาณโพรไบโอติกที่เหลือรอดในไอศกรีมหลังการแช่แข็ง เก็บรักษาไอศกรีมที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 1 เดือน สุ่มตัวอย่างทุกสัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโพรไบโอติกที่เหลือรอดระหว่างการเก็บรักษา การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกนี้ทำตามวิธีของ Christina et al. (2005) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง ข้อ 2 รายงานเป็นปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติก log cfu/g และอัตราการเหลือรอด (%)

การวิเคราะห์ทางสถิติ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13

4. การทดสอบผู้บริโภค

ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรและโพรไบโอติกที่พัฒนาได้ โดยออกแบบสอบถามที่มีรายละเอียดแบ่งเป็น 3 ตอน ได้แก่ ตอนที่ 1 คือ ข้อมูลเกี่ยวกับผู้ตอบแบบสอบถาม เป็นการสอบถามถึงเพศ อายุ อาชีพ และรายได้ ตอนที่ 2 คือ ข้อมูลทัศนคติและพฤติกรรมผู้บริโภคเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเสริมโอลิโกแซคคาไรด์และโพรไบโอติก เป็นการสอบถามถึง ความสนใจในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไอศกรีมและตอนที่ 3 คือ ข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบผลิตภัณฑ์อาหารด้านการยอมรับผลิตภัณฑ์และการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภค ดำเนินการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้ ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบด้านความชอบสี กลิ่นรสหวาน เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยวิธีการทดสอบในที่สาธารณะ (Central location test) กับผู้บริโภคจำนวน 60 คน สุ่มตัวอย่างโดยไม่อาศัยความน่าจะเป็น (Non-probability) แบบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สะดวก (Convenience sampling) ผลจากแบบสอบถามนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติเชิงพรรณา รายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University