# บทที่ 3

## การทดลอง

### วัตถุดิบและสารเคมี

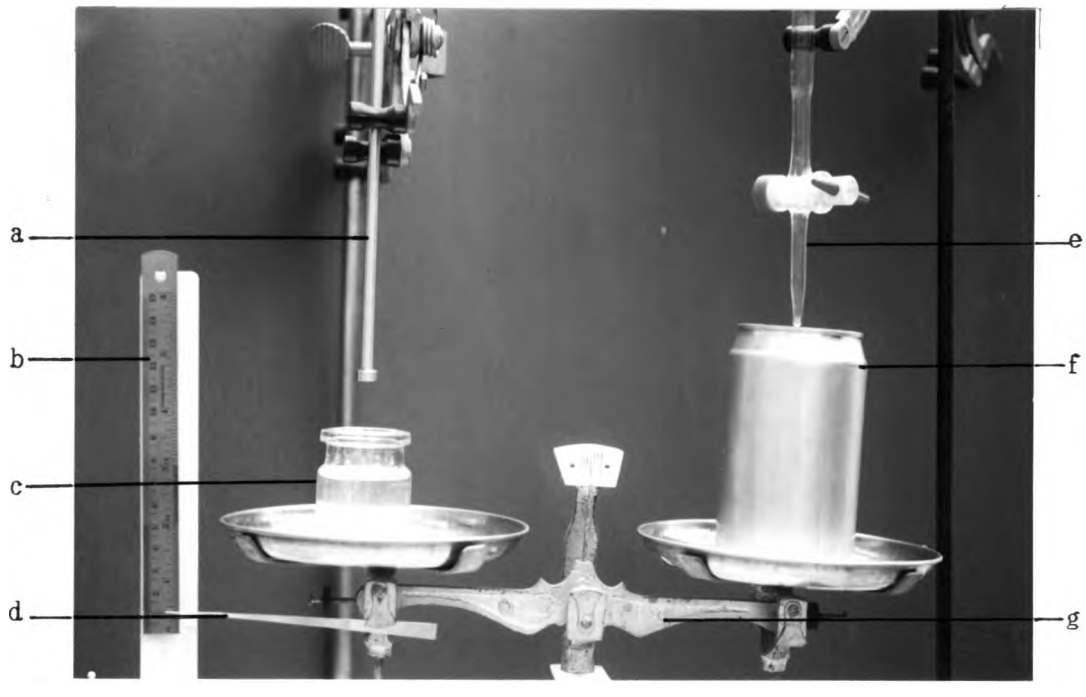
1. วัตถุดิบ
   - น้ำตาลซูโครส (บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด)
   - น้ำตาล glucose syrup (40 Dextrose equivalent) (บริษัทไทยกลูโคส จำกัด)
   - น้ำตาล fructose syrup (42 % Fructose dry basis) (บริษัทเจ้าคุณเกษตรผล จำกัด)
   - เพกตินชนิดเมทอกซีสูงประเภท rapid set (บริษัท Food & Cosmetic Systems Co.,Ltd)
2. สารเคมี
   - 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด (A.R.)
     - Citric acid
   - 2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเมทอกซี (A.R.)
     - Sodium hydroxide
     - Hydrochloric acid
   - 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเยลลี่ ( บริษัทนิวตริชั่น จำกัด)
     - Lychee flavour
     - Carmoisin colour
   - 2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สัดส่วนของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ (HPLC)
     - Acetonitrile ($CH_3N$)
     - Glucose

- Maltose
- Maltotriose
- Maltotetraose
- Fructose

**อุปกรณ์**

1. เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น A 2005)
2. Magnetic stirrer (P-Selecta รุ่น Agimatic-N)
3. เครื่อง pH-meter (Horiba รุ่น F-12)
4. High Performance Liquid Chromatography แบบ LC-3A (ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)
5. เครื่องวัดความแข็งแรงของเจล ที่สร้างขึ้นเพื่อวัดค่า modulus และ firmness มีรายละเอียดดังนี้

5.1 ส่วนประกอบสำคัญของเครื่องมือดังรูปและรายละเอียดข้างล่าง




a = หัวกดซึ่งมีพื้นที่หน้าตัดคงที่

b = สเกลวัดระยะทาง

c = ภาชนะบรรจุเจล

d = เข็มชี้สเกลวัดระยะทาง

e = บิวเรต

f = กระบอกน้ำ

g = เครื่องชั่งสองแขน

รูปที่ 14 เครื่องวัดความแข็งแรงของเจลที่สร้างขึ้นเอง

5.2 การทำงานของแต่ละส่วนประกอบ ซึ่งจะมีการทำงานแตกต่างกันออกไปดังนี้

1. เครื่องชั่งสองแขน (g) ส่วนประกอบชิ้นนี้มีจะปรับสมดุลน้ำหนักระหว่างภาชนะบรรจุเจล (c) และกระบอกน้ำ(f)

2. หัวกด (a) มีพื้นที่หน้าตัดเท่ากับ 0.7854 *$10^{-4}$ ตารางเมตร โดยหัวกดต้องสัมผัสกับผิวหน้าเจลก่อนวัดเสมอ

3. บิวเรต (e) ใช้บรรจุน้ำเพื่อปล่อยลงสู่กระบอกน้ำซึ่งน้ำหนักของน้ำจะกดลงบนกระบอกน้ำ ทำให้เครื่องชั่งเสียสมดุล

4. กระบอกน้ำ (f) เป็นภาชนะรองรับน้ำที่ปล่อยจากบิวเรต

5. ภาชนะบรรจุเจล (c) บรรจุเจลสูง 3 * $10^{-2}$ เมตร

6. สเกลวัดระยะทาง(b) เป็นสเกลวัดระยะทางที่หัวกดเคลื่อนที่ในเนื้อเจล

7. เข็มชี้สเกลวัดระยะทาง (d) เป็นเข็มชี้บนสเกลวัดระยะทาง

เมื่อหยดน้ำลงในกระบอกน้ำ น้ำหนักของน้ำจะทำให้เครื่องชั่งอยู่ในภาวะไม่สมดุล ส่งผลให้เครื่องชั่งเคลื่อนที่ โดยเครื่องชั่งด้านที่มีกระบอกน้ำจะเคลื่อนที่ลงและด้านที่วางภาชนะบรรจุเจลสูง 3*$10^{-2}$ เมตร (L) เคลื่อนที่ขึ้น ส่งผลให้หัวกดซึ่งมีพื้นที่หน้าตัดคงที่ (A) กดลงไปในเนื้อเจลเป็นระยะทาง $\Delta l$*$10^{-2}$ เมตร แรงที่น้ำกระทำต่อกระบอกน้ำจะเท่ากับแรงที่หัวกดกระทำต่อเจล (F) ซึ่งสามารถคำนวณแรงดังกล่าวได้ดังหน้า 36 จากนั้นนำค่า F/A (แกน Y ) และ$\Delta l/L$(แกน X) ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ของค่าทั้งสองดังภาคผนวก ค. และเนื่องจาก

$$\text{modulus} = \text{stress/strain}$$

$$= (F/A)/(\Delta l/L)$$

$$\text{และ slope} = \Delta Y/\Delta X$$

$$= (F/A)/(\Delta l/L)$$

$$\text{ดังนั้น modulus} = \text{slope}$$

ค่า firmness คือแรงต้านทานการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอันเนื่องจากการใส่แรงกระทำจากภายนอกให้กับวัสดุเปลี่ยนรูปร่างเป็นระยะทางคงที่ ซึ่งเครื่อง penetrometer ที่วัดค่า firmness ในผักและผลไม้จะวัดแรงที่หัวกดกระทำต่อตัวอย่างอาหารให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น

I16796957

ระยะคงที่ระยะหนึ่ง(Rao,1990) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวัดค่า firmness โดยวัด F/A ที่ Δl/L เท่ากับ 0.5 จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าทั้งสองดังภาคผนวก ค

**ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย**

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัยดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณเมทอกซีของเพกติน ด้วยวิธีการไตเตรท ทดลอง 2 ซ้ำ ตามวิธีของ Ranganna (1978) (ดังภาคผนวก ก)

- วิเคราะห์สัดส่วนน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำตาลซูโครส,glucose syrup fructose syrup โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดังภาคผนวก ข)

2. ศึกษาช่วง pH และความเข้มข้นน้ำตาลที่ทำให้เกิดเจลของเพกตินชนิดเมทอกซีสูงในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

- ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำตาลซูโครส และ glucose syrup มี 4 ระดับ คือ ร้อยละ 50, 60, 70, 80 โดยน้ำหนัก ส่วนน้ำตาล fructose syrup ความเข้มข้นน้ำตาล มี 3 ระดับคือ 50,60,70 เนื่องจากน้ำตาล fructose syrup ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีความเข้มข้นสูงสุดเพียงร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก

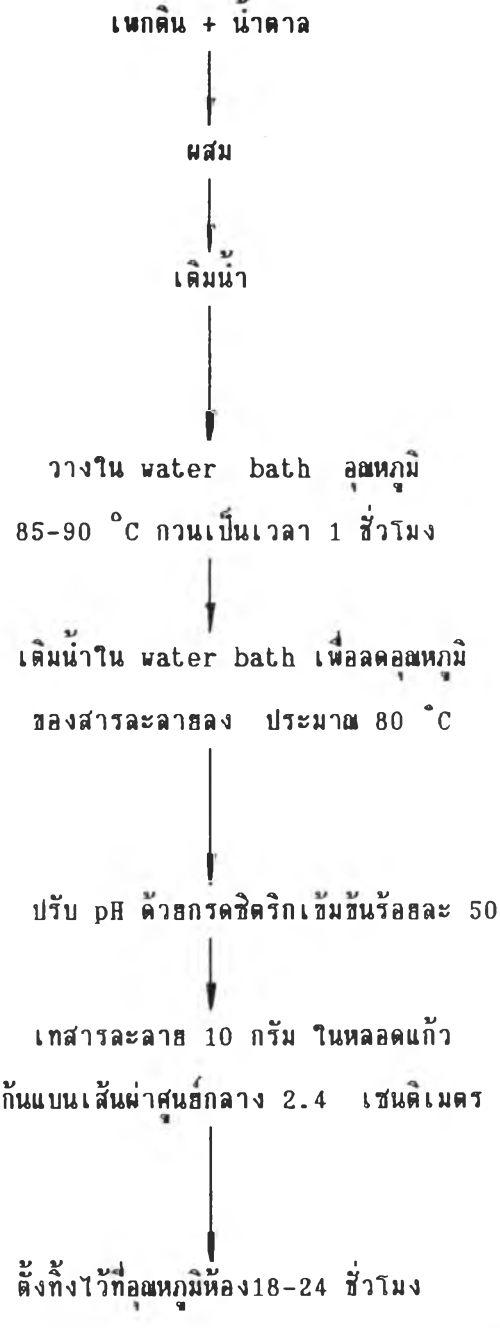
- ช่วงระดับ pH 4 ระดับคือ pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5

เตรียมเจลเพกตินชนิดเมทอกซีสูงตามวิธีของ Oakenfull และ Scott(1984) ขั้นตอนการเตรียมเจลดังรูปที่15 ความเข้มข้นเพกตินร้อยละ 0.5 ใช้กรดซิตริกในการปรับความเป็นกรด

ประเมินผลการทดลองโดยวัดการเกิดเจล ตามวิธีของ Oakenfull และ Scott (1984) ดังรูปที่ 16

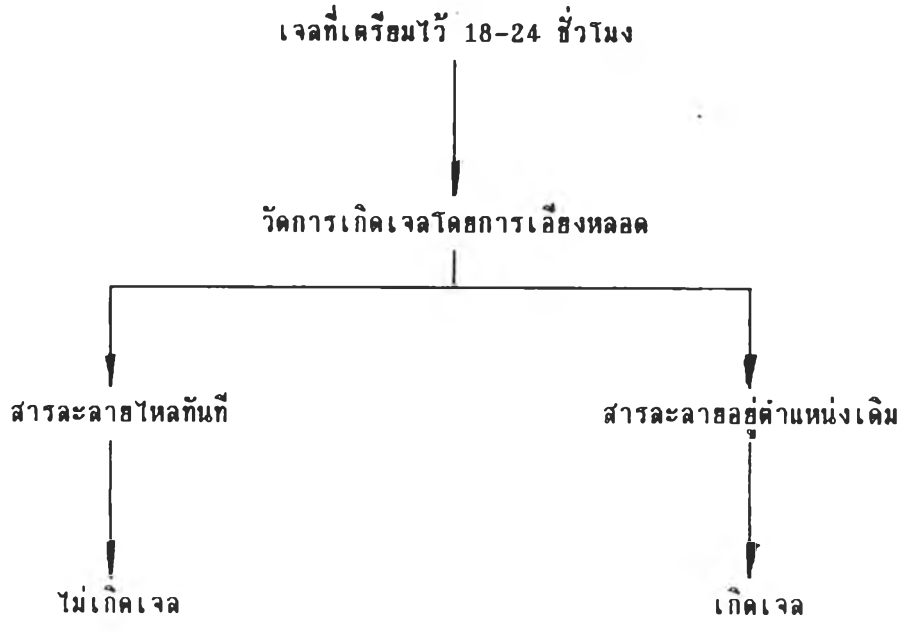
วางแผนการทดลองโดยใช้ symmetric factorial design ขนาด 4*4 ในน้ำตาลซูโครส และ glucose syrup สำหรับน้ำตาล fructose syrup ใช้แผนการทดลองแบบ asymmetric factorial ขนาด3*4 จำนวนการทดลองทั้งหมด 44 การทดลอง ทดลอง

2 ซ้ำ เลือกช่วงความเข้มข้นน้ำตาลและช่วง pH ที่ทำให้เกิดเจลในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด เพื่อนำไปศึกษาผลของระดับ pH ความเข้มข้นและชนิดของน้ำตาลต่อความแข็งแรงของเจลต่อไป




รูปที่ 15 วิธีการเตรียมเจลเพกตินชนิดเมทอกซีสูง

ที่มา : Oakenfull และ Scott, 1984




รูปที่ 16 วิธีการเกิดเจลเพกตินชนิดเมทอกซีสูง

ที่มา : Oakenfull และ Scott, 1984

3. ศึกษาผลของระดับ pH ความเข้มข้นและชนิดน้ำตาลต่อความแข็งแรงของเจลเพกตินชนิดเมทอกซีสูง

- ระดับความเข้มข้นน้ำตาล 5 ระดับ โดยเลือกจากการศึกษาในข้อ 2
- ระดับ pH 5 ระดับ โดยเลือกจากการศึกษาในข้อ 2

เตรียมเจลสูง 3 cm วิธีการเตรียมเจลความเข้มข้นเพกตินและกรดที่ใช้ปรับ pH เช่นเดียวกับ ข้อ 2 โดยเตรียมเจลจากน้ำตาล 3 ชนิดคือ น้ำตาลซูโครส, glucose syrup fructose syrup

วางแผนการทดลองโดยใช้ central composite design สำหรับ 2 ตัวแปรที่ 5 ระดับโดยมี code ของตัวแปรคือ 0, $\pm$1, $\pm$1.414 (Montgomery, 1976) มีจำนวนการทดลองทั้งหมด 13 การทดลองต่อน้ำตาลหนึ่งชนิด จำนวน 2 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 8, 9 และ 10

ประเมินผลการทดลองด้วยการวัดความแข็งแรงของเจลโดยวัดค่า modulus และ ค่า firmness ด้วยเครื่องมือวัดที่สร้างขึ้น (ดังรูปที่ 14 ) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

ตารางที่ 8 แผนการทดลอง central composite design ใน glucose syrup

| การทดลองที่ | Natural Valiables | | Code Variables | |
|---|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH |
| 1 | 51.50 | 2.60 | -1 | -1 |
| 2 | 51.50 | 3.00 | -1 | 1 |
| 3 | 58.50 | 2.60 | 1 | -1 |
| 4 | 58.50 | 3.00 | 1 | 1 |
| 5 | 55.00 | 2.80 | 0 | 0 |
| 6 | 55.00 | 2.80 | 0 | 0 |
| 7 | 55.00 | 2.80 | 0 | 0 |
| 8 | 55.00 | 2.80 | 0 | 0 |
| 9 | 55.00 | 2.80 | 0 | 0 |
| 10 | 60.00 | 2.80 | 1.414 | 0 |
| 11 | 50.00 | 2.80 | -1.414 | 0 |
| 12 | 55.00 | 3.08 | 0 | 1.414 |
| 13 | 55.00 | 2.52 | 0 | -1.414 |

ตารางที่ 9 แผนการทดลอง central composite design ใน fructose syrup

| การทดลองที่ | Natural Valiables | | Code Variables | |
|---|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH |
| 1 | 53.00 | 2.15 | -1 | -1 |
| 2 | 53.00 | 2.85 | -1 | 1 |
| 3 | 67.00 | 2.15 | 1 | -1 |
| 4 | 67.00 | 2.85 | 1 | 1 |
| 5 | 60.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 6 | 60.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 7 | 60.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 8 | 60.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 9 | 60.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 10 | 70.00 | 2.50 | 1.414 | 0 |
| 11 | 50.00 | 2.50 | -1.414 | 0 |
| 12 | 60.00 | 3.00 | 0 | 1.414 |
| 13 | 60.00 | 2.00 | 0 | -1.414 |

ตารางที่ 10 แผนการทดลอง central composite design ในน้ำตาลซูโครส

| การทดลองที่ | Natural Valiables | | Code Variables | |
|---|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH | ความเข้มข้นน้ำตาล | pH |
| 1 | 61.50 | 2.15 | -1 | -1 |
| 2 | 61.50 | 2.85 | -1 | 1 |
| 3 | 68.50 | 2.15 | 1 | -1 |
| 4 | 68.50 | 2.85 | 1 | 1 |
| 5 | 65.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 6 | 65.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 7 | 65.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 8 | 65.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 9 | 65.00 | 2.50 | 0 | 0 |
| 10 | 70.00 | 2.50 | 1.414 | 0 |
| 11 | 60.00 | 2.50 | -1.414 | 0 |
| 12 | 65.00 | 3.00 | 0 | 1.414 |
| 13 | 65.00 | 2.00 | 0 | -1.414 |

มีขั้นตอนการวัดดังนี้

1. วางภาชนะที่บรรจุเจล(c) สูง $3*10^{-2}$ เมตร.(L). ด้านที่มี scale วัดระยะทาง(b) จากนั้นวางกระบอกน้ำ(f)ด้านตรงข้าม ปรับเครื่องชั่ง(g)ให้อยู่ในตำแหน่งสมดุล

2. เลื่อนหัวกด(a) ซึ่งมีพื้นที่หน้าตัดคงที่ ($A = 0.7854*10^{-4}$ ตารางเมตร)ให้สัมผัสบนผิวหน้าเจล

3. เติมน้ำในบิวเรต(e) ให้ถึงขีด 0

4. ค่อย ๆ หยดน้ำจากบิวเรตจนกระทั่งหัวกดเคลื่อนที่ลงไปในเนื้อเจลประมาณ $5*10^{-3}$ เมตร

5. อ่านระยะทางที่หัวกดเคลื่อนที่($\Delta l$, เมตร)จากสเกล(b) และบันทึกค่า

6. อ่านปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ทำให้หัวกดเคลื่อนที่เป็นระยะทาง$\Delta l$(V, ลิตร)บันทึกค่า

7. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4-5 จนได้ระยะที่หัวกดเคลื่อนที่ในเนื้อเจล 5 ระยะทางต่อหนึ่งตัวอย่าง

8. นำปริมาตรที่บันทึกได้ไปคำนวณเป็นแรง (F, $N/m^2$) ดังนี้

$$\text{density} = m/v \quad (Kg/m^3)$$

$$\text{density ของน้ำ} = 1$$

$$\text{ดังนั้น} \quad m = V$$

$$F = mg$$

โดยที่ $m$ = มวลของน้ำ

$g = 9.8\ m/s^2$ (ความเร่งโน้มถ่วงของโลก)

9. นำค่าจากข้อ 2 และข้อ 8 คำนวณ F/A คำนวณค่า $\Delta l$ /L จากข้อ1 และข้อ 5 จากนั้นนำค่า F/A และ $\Delta l$ /L ไปสร้างกราฟโดยให้ F/A เป็นแกน Y ค่า $\Delta l$/L เป็นแกน X(ตัวอย่างกราฟดังภาคผนวก ค) หาค่า modulus จาก slope และค่า firmness จาก F/A ที่ $\Delta l/L = 0.5$

วิเคราะห์ข้อมูลโดย multiple regression analysis และ response surface methodology (RSM) โดยใช้โปรแกรม statgraphics version 5.0 ซึ่งจะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า modulus หรือ ค่า firmness กับค่า pH และความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด และนำสมการความสัมพันธ์ที่ได้ไปสร้างกราฟความ

สัมพันธ์แบบ 3 มิติ และ contour plot ซึ่งจะให้เส้นเท่า (iso-response) ของค่า modulus หรือค่า firmness ที่มีค่าความเข้มข้นน้ำตาล และ pH หลายจุดบนเส้นเท่าของค่าทั้งสองดังกล่าวในน้ำตาลชนิดเดียวกัน และในน้ำตาลต่างชนิดกันอาจให้ค่าหรือเส้นเท่าของค่า modulus หรือ firmness ที่มีค่านั้น ๆ เท่ากันในน้ำตาลฟรุโครส fructose syrup และน้ำตาล glucose syrup ที่ช่วง pH และความเข้มข้นน้ำตาลต่างกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถเตรียมเจลเพื่อให้ได้ค่าความแข็งแรงของเจลตามที่ต้องการหรือเท่ากันได้ โดยวิธีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นน้ำตาล pH และ/หรือชนิดน้ำตาล ซึ่งจะมีผลกระทบต่อรสชาติของเจล ดังนั้นจึงจะศึกษาถึงการยอมรับทางด้านรสชาติของผู้บริโภค โดยใช้เยลลี่เป็นต้นแบบในการศึกษาต่อไป

4. ศึกษาการยอมรับทางด้านรสชาติของเยลลี่ที่เตรียมจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งคัดเลือกได้จาก RSM model

เนื่องจากผลิตภัณฑ์เยลลี่เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสค่อนข้างแข็ง ดังนั้นการศึกษาถึงการยอมรับทางด้านรสชาติของเยลลี่ จะเตรียมเยลลี่จากเส้นเท่าของค่าความแข็งแรงของเจลที่มีค่าสูง ซึ่งคัดเลือกภาวะในการเตรียมได้จาก RSM model แล้วนำมาศึกษาถึงการยอมรับทางด้านรสชาติ เพื่อคัดเลือกตัวอย่างเยลลี่ที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุดในน้ำตาลชนิดเดียวกัน

4.1 ศึกษาการยอมรับทางด้านรสชาติของเยลลี่ที่เตรียมจากน้ำตาลชนิดเดียวกัน

เตรียมเยลลี่จากน้ำตาลฟรุโครส fructose syrup และ glucose syrup จากเพกตินชนิดเมทอกซีสูงตามขั้นตอนในรูปที่ 17 ความเข้มข้นเพกตินและกรดที่ใช้ปรับ pH เช่นเดียวกับข้อ 2 โดยคัดเลือกความเข้มข้นน้ำตาลและระดับ pH ที่ให้ค่าความแข็งแรงเจลสูงตาม RSM model จากข้อ 3 ในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด จำนวน 3 ภาวะต่อน้ำตาลหนึ่งชนิด

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design จำนวนการทดลอง 3 การทดลองต่อน้ำตาลหนึ่งชนิด ทดลอง 2 ซ้ำ ประเมินผลโดยการวัดสมบัติทางกายภาพและการยอมรับของผู้บริโภคดังนี้

- วัดความแข็งแรงของเจลเช่นเดียวกับข้อ 3
- การยอมรับทางด้านรสชาติ โดยใช้ semi-trained panel จำนวน 20 คน ประเมินผลด้วยวิธีการทดสอบแบบให้คะแนน (scoring test) ขนาด 7 point

scale (แบบทดสอบดังในภาคผนวก ง) วิเคราะห์ข้อมูลโดย ANOVA เพื่อหาความมีนัยสำคัญทางสถิติ และคัดเลือกตัวอย่างเยลลี่ที่ผู้บริโภคยอมรับด้านรสชาติมากที่สุดในน้ำตาลแต่ละชนิด โดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test นอกจากนี้ยังศึกษาการยอมรับทางด้านรสชาติในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด เพื่อคัดเลือกชนิดน้ำตาลที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุดในข้อต่อไป

4.2 ศึกษาการยอมรับทางด้านรสชาติของเยลลี่ที่เตรียมจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากัน

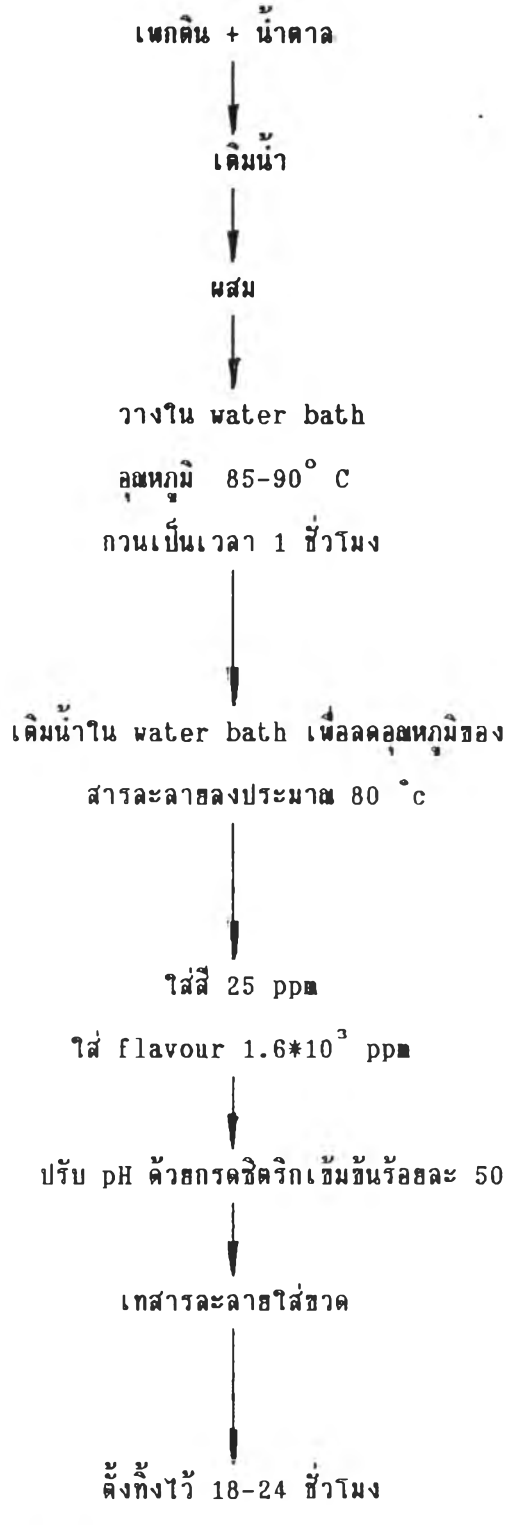
คัดเลือกตัวอย่างเยลลี่ซึ่งมีค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากันที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุดในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยคัดเลือกภาวะในการเตรียมเยลลี่ได้จาก RSM model เพื่อคัดเลือกชนิดน้ำตาลที่ผู้บริโภคยอมรับด้านรสชาติมากที่สุด

เตรียมเยลลี่จากน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด โดยมีวิธีการเตรียมเจล ความเข้มข้นเพกติน กรดที่ใช้ปรับ pH เช่นเดียวกับข้อ 4.1 โดยคัดเลือกความเข้มข้นน้ำตาลและ pHที่ให้ค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากันในน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ตาม RSM model จากข้อ 3 จำนวน 2 ภาวะ ต่อน้ำตาลหนึ่งชนิด

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ประเมินผลโดยวัดสมบัติทางกายภาพและการยอมรับของผู้บริโภคดังนี้

- วัดความแข็งแรงของเจลเช่นเดียวกับข้อ 4.1
- รสชาติและลักษณะเนื้อสัมผัสเจลเช่นเดียวกับข้อ 4.1

วิเคราะห์ข้อมูลและคัดเลือกเยลลี่ที่ผู้บริโภคยอมรับทางด้านรสชาติมากที่สุดเช่นเดียวกับข้อ 4.1




รูปที่ 17 วิธีการเตรียมเยลลี่ดัดแปลงวิธีของ Oakenfull และ Scott(1984)

ที่มา : Oakenfull และ Scott, 1984