

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัตถุดิบ

1. กระจับแดงสด (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) พันธุ์ชูดาน ระยะการเก็บเกี่ยว 120 วัน จากแหล่งปลูก ตำบลควนมีด อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา
2. ฟรุคโตส
3. น้ำผึ้งจากโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา
4. โอลิโกฟรุคโตส ชื่อทางการค้า Frutafit[®] CLR
5. วิตามินอี (แอลฟา-โทโคเฟอรอล อะซิเตต)
6. วิตามินเอ (วิตามินเอ อะซิเตต)

วัสดุและสารเคมี

1. ภาชนะบรรจุสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์กระจับแดงสกัดเข้มข้น
 - ขวดแก้วฝาเกลียวลิ้นขนาดบรรจุ 70 มิลลิลิตร
2. สารเคมี
 - 2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี
 - 2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ
 - Absolute ethanol
 - BHT (Butylhydroxytoluene)
 - DPPH[•] (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

- Folin-Ciocalteu
- Gallic acid
- Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3)
- Potassium chloride
- Sodium acetate

2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์

47

1. อุปกรณ์ในการเตรียมกระเจี๊ยบแดงแห้ง และการสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ
 - ตู้อบลมร้อนชนิดถาดหมุน (rotary air dryer) ประเทศไทย
 - เครื่องบดยี่ห่อ National ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องสกัดน้ำผลไม้ ยี่ห่อ Moulinex ประเทศฝรั่งเศส
 - เครื่องเขย่า (shaker) แบบควบคุมอุณหภูมิได้ ยี่ห่อ Memmert รุ่น WB/OB7-45, WBU 45 ประเทศเยอรมันนี
 - เครื่องทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (freeze dryer) ยี่ห่อ Eyela ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องปิดผนึก ยี่ห่อ Brother ประเทศไทย
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น
 - เครื่องทำให้เข้มข้น โดยใช้ไอน้ำแบบสุญญากาศ ประเทศไทย
3. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ทางกายภาพ และเคมี
 - เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห่อ Ohaus รุ่น TP2KS ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห่อ Mettler Toledo รุ่น AB204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
 - เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand refractometer) ยี่ห่อ Atago รุ่น N1 Brix 0~32% ประเทศญี่ปุ่น
 - เครื่องวัดค่าสี ยี่ห่อ Hunter Lab รุ่น Color Quest XT ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - เครื่องวัดพีเอช ยี่ห่อ Sartorius รุ่น PB-20 ประเทศเยอรมัน
4. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ
 - เครื่อง Microplate Reader ยี่ห่อ Biotek รุ่น Power Wave X ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - เครื่อง UV-visible spectrophotometer ยี่ห่อ Thermo Spectronic รุ่น GENESYS 10series ประเทศสหรัฐอเมริกา

- เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B Plus ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - ตู้อบสูญญากาศ ยี่ห้อ Eylea รุ่น VOS-300VD ประเทศญี่ปุ่น
5. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
- ตู้บ่มปรับอุณหภูมิได้ ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500 ประเทศเยอรมันนี
 - หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ ยี่ห้อ SANYO รุ่น Labo Autoclave ประเทศญี่ปุ่น
6. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมระหว่างอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
- เครื่อง Potentiometer และบันทึกอุณหภูมิ ยี่ห้อ Ellab ประเทศเดนมาร์ก
 - สายเทอร์โมคัปเปิลเปิดจำนวน 6 สาย
 - อุปกรณ์สำหรับประกอบ stuffing box เข้ากับฝาเกลียวล็อก และหัวเข็มเสียบ Thermocouple เบอร์ 401
7. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น
- เครื่องฆ่าเชื้อแบบ steam water spray automated batch ยี่ห้อ FMC Food Tech ประเทศเบลเยียม (ภาพที่ 10)
8. อุปกรณ์สำหรับทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส



ภาพที่ 10 เครื่องฆ่าเชื้อแบบ steam water spray automated batch

Figure 10 Steam water spray automated batch retort

วิธีการ

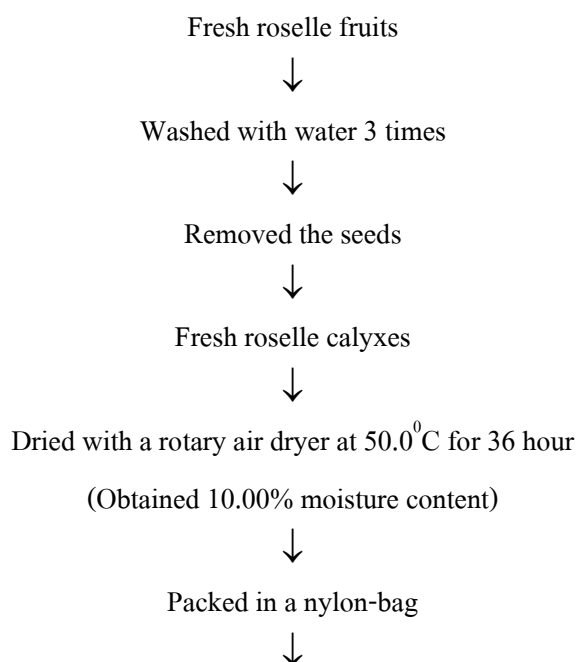
1. การเตรียมและการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบ

1.1 การเตรียมกระเจี๊ยบแดงสด

นำกระเจี๊ยบแดงสดทั้งผล มาล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง แล้วกระทุ้งเอาเมล็ดออก จะได้กระเจี๊ยบแดงสด

1.2 การเตรียมกระเจี๊ยบแดงแห้ง

นำกระเจี๊ยบแดงสดที่กระทุ้งเอาเมล็ดออกแล้ว มาอบในตู้อบลมร้อนชนิดคาดหมุน ที่อุณหภูมิ 50.0°C นาน 36 ชั่วโมง จนกระเจี๊ยบแดงแห้งมีปริมาณความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 10.00% (ภาคภูมิ พาณิชยุปการนนท์, 2545) นำกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้ มาบรรจุในถุงไนลอน ปิดปากถุงให้สนิท โดยใช้เครื่องปิดผนึก แล้วนำมาเก็บในกล่องโฟม ที่อุณหภูมิ $27.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ จนกระทั่งนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ขั้นตอนการเตรียมกระเจี๊ยบแดงอบแห้ง ดังแสดงในภาพที่ 11



Stored in a stylofoam box at $27.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ until used

ภาพที่ 11 การเตรียมกระเจี๊ยบแดงอบแห้ง

Figure 11 Preparation of dried roselle calyxes

ที่มา: ดัดแปลงจาก Tsai และคณะ (2002)

1.3 คำนวณร้อยละของผลผลิตของกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง

$$\text{ร้อยละของผลผลิตของกระเจี๊ยบแดงสด} = \frac{\text{น้ำหนักกระเจี๊ยบแดงสดหลังกระทุ้งเอาเมล็ดออก}}{\text{น้ำหนักกระเจี๊ยบแดงสดก่อนกระทุ้งเอาเมล็ดออก}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละของผลผลิตของกระเจี๊ยบแดงแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักกระเจี๊ยบแดงแห้งหลังการทำแห้ง}}{\text{น้ำหนักกระเจี๊ยบแดงสดก่อนการทำแห้ง}} \times 100$$

1.4 วิเคราะห์คุณภาพทางกายและเคมีของน้ำคั้นจากกระเจี๊ยบแดงสด

นำกระเจี๊ยบแดงสดมาคั้นน้ำด้วยเครื่องสกัดน้ำผลไม้ แล้วนำน้ำคั้นจากกระเจี๊ยบแดงสดที่ได้มาวัดค่าสี ด้วยเครื่อง Hunter Lab โดยใช้ระบบ CIE LAB L^* a^* และ b^* ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer (A.O.A.C., 2000) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดมาลิก (A.O.A.C., 2000) และค่าพีเอช โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ (A.O.A.C., 2000)

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในสกัดกระเจี๊ยบแดง

2.1 อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ

2.1.1 การเตรียมการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ

การสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ กระเจี๊ยบแดงสดต่อน้ำ 1 ต่อ 2, 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 60.0°C นาน 60 นาที แล้วนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดมากรองด้วยผ้ากรอง นำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

2.1.1.1 คุณภาพทางกายภาพ

- วัดค่าสีโดยระบบ CIE LAB L^* a^* และ b^* โดยเครื่อง Hunter Lab

2.1.1.2 คุณภาพทางเคมี

- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดมาลิก

- ค่าพีเอช

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (ในผักและผลไม้) โดยใช้ Hand Refractometer (Nielse, 1994)

2.1.1.3 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด แสดงในรูปกรดแกลลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Miliauskas *et al.*, 2004)

- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด แสดงในรูปไซยานิดิน 3-กาแลกโตไซด์ (Fuleki *et al.*, 1968)

- กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Free-Radical Scavenging DPPH แสดงค่าเป็น EC_{50} (ดัดแปลงจาก Yamasaki *et al.*, 1994) โดยนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดแห้งที่อุณหภูมิ -40.0°C ความดัน 0.002 เซนติเมตรปรอท เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเตรียมความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 100, 50, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาเลือกอัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงสดต่อน้ำที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

2.1.2 การเตรียมการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ

นำกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้จากข้อ 1.2 มาบดด้วยเครื่องบด โดยบดเป็นเวลา 3 วินาที แล้วนำกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้มาสกัดด้วยน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ กระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำ 1 ต่อ 5 และ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 60.0°C นาน 60 นาที แล้วนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งมากรองด้วยผ้ากรอง นำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test พิจารณาเลือกอัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

2.2 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ

2.2.1 การเตรียมการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

นำอัตราส่วนกระเจียบแดงสดต่อน้ำที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.1.1 มาเตรียมการสกัดกระเจียบแดงสดด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิในการสกัด 2 ระดับ คือ 50.0⁰ซ และ 60.0⁰ซ เวลาในการสกัด 2 ระดับ คือ 30 และ 60 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ นำสารสกัดกระเจียบแดงสดที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาเลือกอุณหภูมิและเวลาในการสกัดกระเจียบแดงสดด้วยน้ำที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

2.2.2 การเตรียมการสกัดกระเจียบแดงแห้งด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

นำอัตราส่วนกระเจียบแดงแห้งต่อน้ำที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.1.2 มาเตรียมการสกัดกระเจียบแดงแห้งด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิในการสกัด 2 ระดับ คือ 50.0⁰ซ และ 60.0⁰ซ เวลาในการสกัด 2 ระดับ คือ 30 และ 60 นาที โดยใช้เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ นำสารสกัดกระเจียบแดงแห้งที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาเลือกอุณหภูมิและเวลาในการสกัดกระเจียบแดงแห้งด้วยน้ำที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

3. เปรียบเทียบวิธีการทำให้เข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดง

3.1 การเตรียมสารสกัดกระเจียบแดงสดเข้มข้น

นำสารสกัดกระเจียบแดงสดที่สกัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.2.1 มาเตรียมสารสกัดกระเจียบแดงสดเข้มข้น โดยการเปรียบเทียบวิธีการทำให้เข้มข้น 2 วิธี คือ การทำให้เข้มข้นโดยการใช้น้ำแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70.0⁰ซ ความดัน 44 เซนติเมตรปรอท เปรียบเทียบกับการทำให้เข้มข้นของสารสกัดกระเจียบแดงสด โดยใช้ไอน้ำแบบบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 90.0⁰ซ จนสารสกัดกระเจียบแดงสดเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 25.0⁰ปริกซ์ นำสารสกัดกระเจียบแดงสดเข้มข้นที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test พิจารณาเลือกวิธีการทำให้เข้มข้นของ

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

3.2 การเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้น

นำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งที่สกัดที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.2.2 มาเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้น โดยการเปรียบเทียบวิธีการทำให้เข้มข้น 2 วิธี คือ การทำให้เข้มข้นโดยการใช้อุณหภูมิแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70.0⁰ซ ความดัน 44 เซนติเมตรปรอท เปรียบเทียบกับการทำให้เข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้ง โดยใช้อุณหภูมิแบบบรรยากาศปกติ ที่อุณหภูมิ 90.0⁰ซ จนสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดเข้มข้นมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 25.0⁰บริกซ์ นำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้นที่ได้มาตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.1 ถึง 2.1.1.3

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ T-test พิจารณาเลือกวิธีการทำให้เข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด จากชุดการทดลองที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

4. การพัฒนาสูตรส่วนผสมของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

4.1 พัฒนาสูตรกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

นำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้นที่ได้จากวิธีการทำให้เข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.2 แล้วนำมาปรับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้น (A) ให้เท่ากับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดที่ได้จากการคั้นน้ำจากกระเจี๊ยบแดงสด (B) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$A = \frac{\text{นน.ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นหลังอบ}}{\text{นน.ของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงเข้มข้นก่อนอบ}} \times 100$$

$$B = \frac{\text{นน.ของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดหลังอบ}}{\text{นน.ของน้ำกระเจี๊ยบแดงสดก่อนอบ}} \times 100$$

โดยการอบหาล้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและน้ำกระเจี๊ยบแดงสด ใช้ตู้อบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิเท่ากับ 70.0⁰ซ ความดัน 25 เซนติเมตรปรอท เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Nielsen, 1994) แล้วนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้มาพัฒนาสูตรกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

ชั้น โดยมีทั้งหมด 3 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยบรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวลึอกความจุ 70 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ณ จุดร้อนซ้ำที่สุดที่อุณหภูมิ 85.0⁰ซ นาน 5 นาที ทำให้เย็นลงทันที โดยอุณหภูมิของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเท่ากับอุณหภูมิห้อง (27.0±1.0⁰ซ) ก่อนทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

4.2 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นทั้ง 3 สูตร ดังกล่าวข้างต้น ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-point hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบชิมทั่วไป จำนวน 30 คน โดยมีคุณลักษณะในการพิจารณาซึ่งประกอบด้วยคุณลักษณะด้าน สี รสหวาน รสเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับโดยรวม วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block, RCBD) คัดเลือกชุดการทดลองที่เหมาะสมที่ให้คะแนนความชอบในคุณลักษณะด้านการยอมรับโดยรวมสูงที่สุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่สูตรส่วนผสมต่างๆ

Table 6 Concentrated roselle extract product with different formulas

Ingredient (%)	Formulas		
	1	2	3
Concentrated roselle extract	50.0000	55.0000	60.0000
Fructose	31.9835	26.9835	21.9835
Honey	10.0000	10.0000	10.0000
Oligofructose	8.0000	8.0000	8.0000
Vitamin E	0.0130	0.0130	0.0130
Vitamin A	0.0035	0.0035	0.0035
Total	100.0000	100.0000	100.0000

5. การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

5.1 การผลิตกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น

นำกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ผ่านการบดมาแล้ว 3 วินาที มาสกัดด้วยน้ำที่อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.1.2 มาเตรียมการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 2.2.2 โดยการสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำในถัง

สแตนเลสความจุ 50 ลิตร ที่ให้ความร้อนจากเครื่องทำความร้อนแบบแท่ง (Barheater) โดยมีเทอร์โมคัปเปิลเป็นตัววัดอุณหภูมิ และส่งสัญญาณไปให้เทอร์โมสแตตเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิในการสกัดให้คงที่ แล้วนำสารสกัดกระเจียบแดงแห้งที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 แล้วนำสารสกัดจากกระเจียบแดงเข้มข้นที่ได้มาปรับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของสารสกัดกระเจียบแดงเข้มข้น ($26.79 \pm 0.04\%$) ให้เท่ากับร้อยละของปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำกระเจียบแดงสดที่ได้จากการคั้นน้ำจากกระเจียบแดงสด ($7.44 \pm 0.07\%$) แล้วนำมาเติมส่วนผสมต่างๆ จากการคัดเลือกสูตรแล้วจากข้อ 4.2 จะได้กระเจียบแดงสกัดเข้มข้น แล้วนำมาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

5.2 หาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

5.2.1 ติดตั้งส่วน stuffing box เข้ากับฝาขวดแก้วจำนวน 12 ฝา โดยให้ส่วนปลายของเทอร์โมคัปเปิลอยู่ที่ตำแหน่งจุดร้อนซ้ำที่สุดของขวดแก้วประมาณ 1/2 และ 1/3 เท่าของความสูงของขวดแก้ว วัดจากก้นขวด จำนวนอย่างละ 3 ขวด ทำการผลิตกระเจียบแดงสกัดเข้มข้นตามข้อ 5.1 และบรรจุกระเจียบแดงสกัดเข้มข้นขณะร้อนอุณหภูมิ 85.0°C ลงในขวดแก้วจำนวน 6 ใบ ปิดฝาที่ติดตั้ง stuffing box เรียบร้อยแล้วให้แน่นสนิท และตรวจคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของกระเจียบแดงสกัดเข้มข้นก่อนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

5.2.2 เสียบปลายเทอร์โมคัปเปิลจำนวน 6 สาย เข้ากับ stuffing box ที่ส่วนฝาขวดส่วนอีก 1 สาย ใช้วัดอุณหภูมิของเครื่องฆ่าเชื้ออาหาร จัดเรียงขวดแก้ว 6 ขวด บนตะแกรงของเครื่องฆ่าเชื้อ เรียงกระป๋องจำลอง (dummy cans) ให้เต็มช่องว่างแต่ละชั้นและใช้แผ่นกั้น (divider plate) วางสลับระหว่างชั้นของกระป๋องจำลองจนเต็มตะแกรง ($50 \times 54 \times 54$ เซนติเมตร) จำนวน 9 ชั้น ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งของเทอร์โมคัปเปิลต่อเข้ากับเครื่อง Potentiometer และบันทึกอุณหภูมิ ติดตั้งอุปกรณ์คอมพิวเตอร์และใช้โปรแกรมการทำงาน (LOG-TEC FMC FoodTech, ประเทศเบลเยียม) ของเครื่องฆ่าเชื้อสำหรับฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ จึงปิดฝาเครื่องฆ่าเชื้อ เริ่มโปรแกรมการทำงาน บันทึกอุณหภูมิทุกๆ 1 นาที จนกระทั่งกระเจียบสกัดเข้มข้นทั้ง 6 ขวดมีอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 85.0°C เวลานาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นอุณหภูมิลดลงเหลือ $40.0-50.0^{\circ}\text{C}$

5.2.3 ก่อนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ตรวจคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณวิตามินเอและวิตามินอีโดยใช้วิธี HPLC (A.O.A.C., 1990 อ้างโดย สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2549) ดังแสดงในภาคผนวก ข

5.2.4 ทำการทดลองในข้อ 5.2.2 จำนวน 2 ซ้ำ การทดลอง โดยการทดลองครั้งที่ 1 ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นจำนวน 6 ขวด สำหรับหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (ตามวิธีทดลองข้อ 5.2.1 ถึงข้อ 5.2.2) และการทดลองซ้ำที่ 2 ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นจำนวน 24 ขวด โดยผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นจำนวน 6 ขวด สำหรับหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในระหว่างการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นจำนวน 6 ขวด สำหรับบ่มเพื่อวิเคราะห์ดังรายละเอียดในข้อ 5.2.5 ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นจำนวน 6 ขวด สำหรับบ่มเพื่อวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37.0⁰ซ และจำนวน 6 ขวด สำหรับบ่มเพื่อวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 55.0⁰ซ

5.2.5 ตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นหลังการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการทดสอบ sterility test (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2523) ดังนี้

- Coliform bacteria (USFDA., 2002)
- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (USFDA., 2001b)
- จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (USFDA., 2001c)

นำข้อมูลอุณหภูมิและเวลา (ตารางภาคผนวก ค) ที่บันทึกได้ มาเขียนกราฟการส่งผ่านความร้อน (heat penetration curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (⁰ซ) และเวลา (นาที)

5.2.6 หลังการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณวิตามินเอและวิตามินอี

6. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วในระหว่างการเก็บรักษา

6.1 ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นตามข้อ 5.1 แล้วบรรจุในขวดแก้วขนาดบรรจุ 70 มิลลิลิตร ที่มีฝาเกลียวล็อก โดยการบรรจุขณะร้อนอุณหภูมิ 85.0⁰ซ ปิดฝาทันที แล้วนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แบบพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิและเวลาที่ได้จากข้อ 5.2.2 ทำการเก็บรักษากระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่บรรจุขวดแก้วขนาด 70 มิลลิลิตร และบรรจุในกล่องกระดาษขนาด 5.5 x 5.5 x 7.5 เซนติเมตร (กว้าง x ยาว x สูง) ชนิดของกระดาษ คือ duplex board (กระดาษขาวเทา) ความหนา 0.37 มิลลิเมตร ก่อนจะนำไปเก็บรักษา ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษา 2 ระดับ คือ 4.0±1.0⁰ซ และ 27.0±1.0⁰ซ เก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน

6.2 สุ่มตัวอย่างทุก 15 วัน จนครบ 60 วัน วิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ดังนี้

6.2.1 คุณภาพทางเคมี

- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดมาลิก
- ค่าพีเอช
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

6.2.2 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

- ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด แสดงในรูปกรดแกลลิก
- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด แสดงในรูปไซยานิดิน 3-กลูโค

ไซค์ (Wrolstad, 1976)

- กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Free-Radical Scavenging DPPH แสดงค่าเป็น EC_{50} (ดัดแปลงจาก Yamasaki *et al.*, 1994) โดยนำสารสกัดกระเจี๊ยบแดงผงแห้งที่ผ่านการทำให้แห้งแบบระเหิดแห้งที่อุณหภูมิ $-40.0^{\circ}C$ ความดัน 0.002 เซนติเมตรปรอท เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเตรียมความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1,000, 800, 600, 300 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน

6.2.3 คุณภาพทางจุลินทรีย์

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด
- ปริมาณยีสต์และรา

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และจัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล 5×2 (ระยะเวลาเก็บรักษา x อุณหภูมิเก็บรักษา) รวมเป็น 10 ชุดการทดลอง ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

6.3 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ $4.0 \pm 1.0^{\circ}C$ และ $27.0 \pm 1.0^{\circ}C$ เก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน โดยการสุ่มตัวอย่างทุก 30 วัน เป็นเวลา 60 วัน ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-point hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบชิม ที่ผ่านการทดสอบชิมกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมาแล้ว จำนวน 12 คน โดยมีคุณลักษณะในการพิจารณาซึ่งประกอบด้วยคุณลักษณะด้าน สี รสหวาน รสเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับโดยรวม วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block, RCBD) และจัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล 3×2 (ระยะเวลาเก็บรักษา x อุณหภูมิเก็บรักษา) รวมเป็น 6 ชุดการทดลอง

6.4 คำนวณต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นบรรจุขวดแก้วฝาเกลียวลึอกขนาดความจุ 70 มิลลิลิตร (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์ วาสิกและคณะ, 2541)