บทที่ 3

วิธีทำการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

นมพร่องมันเนยพาสเจอร์ไรส์ตราโฟรโมสต์ (บริษัท ฟรีสแลนด์ ฟู้ดส์ โฟร์โมสต์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน))

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต

1. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสองตำแหน่ง model BP3100S (Sartorius, Germany)
2. เทอร์โมมิเตอร์แบบแท่งแก้ว 0-100 องศาเซลเซียส (thermometer, OAKTON, Japan)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmert; Um500, Germany)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath, Memmert, Germany)
5. เครื่องผสมอาหาร (food mixer: Kitchen Aid Heavy duty; model 5K5SS, USA)
6. ตู้อบไมโครเวฟ (LG; รุ่น MS-2447BW, Korea)
7. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
8. ไมโครปิเปต ขนาด 20-1000 ไมโครลิตร (Brand, Germany)
9. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (erlenmeyer flask, Germany)
10. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร (beaker; Pyrex, England)
11. เครื่องปั่นผสม (kitchen aid Heavy Duty Bowl Lift Stand Mixer รุ่น 5K5SS, USA)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Consort; model C830, Belgium)
2. เครื่องวัดค่าสีด้วยระบบ (chromameter, Minolta; model CR 300, Japan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (hand refractometer, ATAGO; model N1 Brix O-32, Japan)
4. เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Aqualab Model series 3, Decagon Device Ice; model CX3TE, USA)
5. เครื่องวัดความหนืด (Brookfield digital viscometer; model LVDV-II+, Germany)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer, Biomate; model V-530, England)
7. ชุดภาชนะโลหะสำหรับหาความชื้น (moisture can)
8. ตู้อบแบบลมร้อน (Hot air oven, Memmert; Termaks model ULM 500 European union)
9. เครื่อง High performance liquid chromatographic (HPLC, Agilent technologies 1200 series, United States)
10. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (scanning electron microscope, JEOL model JSM-5910lv, Japan)
11. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสี่ตำแหน่ง (4 digits electronic analytical balance, Sartorius; A120S, Germany)
12. ชุดกลั่น Soxtec/thimble (soxtec Avani 2050 SOXTEC Auto Extraction Unit, Switzerland)
13. โถแก้วดูดความชื้น (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น
14. บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร (beaker, Pyrex, England)
15. กระบอกตวงขนาด 10, 100 และ 2,000 มิลลิลิตร (cylinder, Pyrex, USA)
16. หลอดแก้วทดลอง (test tube, Pyrex, USA)
17. ปิเปตขนาด 10 และ 25 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
18. กระบอกฉีดน้ำกลั่น
19. เครื่องให้ความร้อนแบบเตาไฟฟ้า (hot plate stirrer, IKA C-MAG HS 7, USA)
20. กรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
21. Cuvette ขนาด 4.5 มิลลิลิตร (Glassbrand®, South Africa)
22. กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

23. ช้อนตักสารเคมี
24. Tip (Scientific plastic, USA)
25. หลอดหยด
26. แท่งแก้วคนสาร
27. กรวยกรอง
28. ตู้ดูดควัน (Hood; Bosstech fume hood, USA)
29. ขาตั้งเหล็กพร้อมที่จับ
30. ตู้เย็น (Whirlpool; model WCF-95L, Japan)
31. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบพกพา (Dino-lite digital microscope; model AM-3013T, Taiwan)

3.2.3 ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. คอมพิวเตอร์ (notebook; Asus K40IJ, China)
2. โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชั่น 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)
3. โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel 2003 (Microsolf corp., USA)

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการผลิตน้ำเวย์

1. มอลโตเดร็กซ์ตริน DE 11.3 (Maltodextrin, บริษัท ยูเนี่ยน ซายน์ จำกัด, เชียงใหม่)
2. กลีเซอรอลโมโนสเตียเรต (Glycerol monostearate, บริษัท ยูเนี่ยน ซายน์ จำกัด, เชียงใหม่)
3. เมทโธเซล (Methocel) บริษัท โอ วี เคมีคอลแอนด์ซัพพลาย จำกัด, เชียงใหม่
4. เอนไซม์เรนเนท (Rennet enzyme) (บริษัท เบรนน์แท็ก อินกรีเดียนส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน))

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl, RCI Labscan, Thailand)
2. โบวายซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, Fluka, Switzerland)
3. โคแมสซีบริลเลียนบลู จี250 (Coomassie Brilliant blue G250, Fluka, Switzerland)
4. เอทานอล 95% (เคมีภัณฑ์, ประเทศไทย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid, RCI Labscan, Thailand)
6. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether, RCI Labscan, Thailand)
7. คอบเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, Ajax, Australia)
8. โซเดียมโปรแตสเซียมตาร์เตรต (Sodium potassium tartrate, Ajax Finechem, Australia)
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Ajax, Australia)
10. โปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, Ajax, Australia)
11. ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether, RCI Labscan, Thailand)
12. ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate, RCI Labscan, Thailand)
13. โมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (Monobasic sodium phosphate, RCI Labscan, Thailand
14. กรดออโธฟอสฟอริค (Orthophosphoric acid 85%, RCI Labscan, Thailand)
15. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, Ajax, Australia)
16. น้ำกลั่นตรา โพลสตาร์ (Distilled water, บริษัทเชียงใหม่โพลสตาร์ (1992) จำกัด มหาชน ประเทศไทย)

3.4 วิธีการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาผลของชนิดของน้ำเวย์ ความร้อน และเวลาในการคงอุณหภูมิต่อสมบัติเกี่ยวกับโฟม และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเวย์

1.1 การเตรียมน้ำเวย์

ทำการเตรียมน้ำเวย์ 2 ชนิด ดังนี้ (Crudden and Kelly, 2003)

1.1.1 Acid whey เตรียมโดยการเติม 1.4 N HCl ลงใน นมพร่องมันเนยที่ผ่านการพาสเจอไรซ์แล้ว (pasteurized skim milk, PSM) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จนกระทั่งมีค่า pH สุดท้าย 4.5-4.6 จากนั้นตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 10-15 นาที แล้วอุ่นใน water bath จนมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมที่ได้ไปกรองผ่านตะแกรงเพื่อแยกเอาน้ำเวย์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.1.2 Sweet whey เตรียมโดยการเติม rennet ปริมาณร้อยละ 0.04 โดยปริมาตรลงใน PSM นำส่วนผสมไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสจนเกิดการตกตะกอนของโปรตีน (โดยทั่วไป ประมาณ 45 นาที) ตัดโปรตีนส่วนที่ตกตะกอน แล้วนำส่วนผสมไปอุ่นใน water bath

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จนมีอุณหภูมิ ประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงแยกน้ำเวย์ด้วยตะแกรงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำตัวอย่างน้ำเวย์ทั้งสองชนิดมาวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ ดังนี้

สมบัติทางกายภาพ ได้แก่

- วัดค่าสี L*a*b* ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Minolta, CR300)
- ค่าความหนืด โดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer)
- ค่าความถ่วงจำเพาะ (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)

สมบัติทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด- ด่าง ด้วย pH meter
- ปริมาณน้ำตาลแลคโตส (AOAC, 2000)
- ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์โดย Bradford method (Bradford, 1976)
- ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสุ่มแบบง่าย และทำการวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ ของตัวอย่างน้ำเวย์ จำนวน 3 ซ้ำ

1.2 การวิเคราะห์สมบัติเกี่ยวกับโฟมของน้ำเวย์

นำน้ำเวย์ทั้ง 2 ชนิด ไปให้ความร้อน จนมีอุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยคงเวลาที่แต่ละอุณหภูมินาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างน้ำเวย์แต่ละสภาวะไปทดสอบสมบัติเกี่ยวกับการเกิดโฟม (foaming properties) ของน้ำเวย์โดยใช้เครื่องปั่นผสม ที่ระดับความเร็วสูงสุด (ระดับความเร็ว 10) ทำการวัดปริมาตร (volumetric method) ของโฟมที่สร้างด้วยวิธีการพ่นฟอง (bubbling method) (Mohan et al., 2006) ใน 2 คุณลักษณะ คือ

1.2.1 ความสามารถในการสร้างโฟม (foamability) วัดในรูปการขยายตัวของโฟม (foam expansion, FE) โดยค่าแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรที่เพิ่มขึ้นหลังจากให้อากาศแก่สารละลายโปรตีนนาน 30 นาที เทียบกับปริมาตรสารละลายเริ่มต้น ดังสมการ (1)

$$\% \text{ Foam expansion (FE)} = \frac{\text{Foam volume}}{\text{Initial liquid volume}} \times 100 \qquad (1)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 ความคงตัวของโฟม (foam stability) วัดในรูปความคงตัวของโฟมเชิงปริมาตร (Foam volume stability, FVS) โดยค่าแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของโฟมที่เหลืออยู่ (foam remaining) หลังเวลาผ่านไป 30 นาที อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสเทียบกับโฟมเริ่มต้น ดังสมการ (2)

$$\% \text{ Foam volume stability (FVS)} = \frac{\text{Volume of foam retained after 30 min}}{\text{Volume of foam soon after bubbling}} \times 100 \qquad (2)$$

1.3 แผนการทดลอง

ทำวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test (DMRT)

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของปริมาณของแข็งทั้งหมด และระยะเวลาในการสร้างโฟมต่อสมบัติของโฟมน้ำเวย์

2.1 การเตรียมตัวอย่าง และการสร้างโฟมน้ำเวย์

นำตัวอย่างน้ำเวย์มาปรับปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) ด้วย maltodextrin เพื่อให้ได้ปริมาณ total solid เริ่มต้นของน้ำเวย์ 3 ระดับ ที่ร้อยละ 15, 25 และ 30 โดยน้ำหนักจากนั้นนำตัวอย่างน้ำเวย์ไปผ่านความร้อนตามสภาวะที่ทำให้คุณสมบัติเกี่ยวกับโฟมของน้ำเวย์ดีที่สุด จากการศึกษาในตอนที่ 1 นำน้ำเวย์ที่เตรียมได้ไปสร้างโฟมโดยวิธีการตีปั่น (whipping method) โดยเครื่องปั่นผสมอาหารที่เวลาการสร้างโฟมที่ต่างกัน

2.2 การวิเคราะห์สมบัติของโฟมน้ำเวย์

เก็บตัวอย่างโฟมน้ำเวย์ที่แต่ละสภาวะการทดลองนำไปวิเคราะห์สมบัติดังต่อไปนี้

- ความหนาแน่นของโฟม (foam density) ตามวิธีที่อ้างโดย Labelle (1996)
- ค่าโอเวอร์รัน (overrun) (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000) ตามสมการ 3

$$\text{Overrun} = \frac{\text{Foam Density}}{\text{Density of mixture}} \times 100 \qquad (3)$$

- ความคงตัวของโฟม (Foam stability) ตามวิธีที่อ้างโดย Sauter and Montoure (1972)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test (DMRT)

ตอนที่ 3การศึกษาผลของสารก่อโฟมต่อสมบัติของโฟมน้ำเวย์

3.1 การเตรียมตัวอย่าง และการสร้างโฟมน้ำเวย์

เตรียมส่วนผสมน้ำเวย์ตามสภาวะที่ทำให้คุณสมบัติเกี่ยวกับโฟมของน้ำเวย์ดีที่สุด จากการศึกษาในตอนที่ 2 มาเติมสารก่อโฟม (foaming agent) 3 ชนิดคือ เมโธเซล (methocel), กลีเซอรอลโมโนสเตียเรต (glycerol monostearate, GMS) และ เมโธเซลและกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักที่ระดับความเข้มข้นของสารก่อโฟมแต่ละชนิด 3 ระดับ (ร้อยละ 0.5, 1.5 และ 3.0 โดยน้ำหนัก) นำส่วนผสมไปตีให้เกิดโฟมด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการศึกษาตอนที่ 2

3.2 การวิเคราะห์สมบัติของโฟมน้ำเวย์

นำตัวอย่างโฟมน้ำเวย์มาทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการศึกษาในตอนที่ 2

3.3 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test (DMRT)

ตอนที่ 4 การศึกษาผลของวิธีการทำแห้งต่อลักษณะการทำแห้ง และสมบัติของเวย์โปรตีนผง

4.1 การเตรียมโฟมน้ำเวย์

เตรียมตัวอย่างโฟมน้ำเวย์ตามสภาวะที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในตอนที่ 3 แล้วนำไปอบในตู้อบ 2 ชนิด เพื่อให้ได้ ปริมาณความชื้นสุดท้าย 0.03 kg/kg (dry basis) ตามสภาวะ ดังนี้

- ตู้อบลมร้อน โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการอบ คือ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วลม (superficial air velocity) 0.5 เมตรต่อวินาที บันทึกการเปลี่ยนแปลงของความชื้นตัวอย่างในระหว่างการอบทุกๆ 5 นาที
- ตู้อบไมโครเวฟ โดยผันแปรกำลังไฟฟ้า 3 ระดับ คือ 640, 720 และ 800 W บันทึกการเปลี่ยนแปลงของความชื้นตัวอย่างในระหว่างการอบทุกๆ 1 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การวิเคราะห์คุณลักษณะการอบแห้ง

คุณลักษณะการอบแห้งจะทำการประเมินจาก

- เส้นการอบแห้ง (drying curve)
- เส้นอัตราการอบแห้ง (drying rate curve)

4.3 การวิเคราะห์สมบัติของผงเวย์โปรตีน

ทำการวิเคราะห์สมบัติของเวย์โปรตีนผงที่ได้ เทียบกับเวย์โปรตีนผงที่มีจำหน่ายเชิงพาณิชย์ ดังนี้

- ปริมาณโปรตีน (Barbano and Clark, 1989; Barbano et al., 1989)
- ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)
- ปริมาณแลคโตส (AOAC, 2000)
- ค่า pH (pH meter) (AOAC, 2000)
- ปริมาณความชื้น (moisture content) (AOAC, 2000)
- Water activity (a_w meter) (AOAC, 2000)
- ความสามารถในการละลาย (Jambrak et al., 2007)
- ค่าสี L* a* b* ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Minolta, CR300)
- โครงสร้างทางจุลภาค (microstructure) โดยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope) (Giri and Suresh, 2007)

4.4 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rank Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved