บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 วิธีการวิจัย

นำผลเลมอนที่ได้จากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด จ.เชียงใหม่ มาวิเคราะห์คุณภาพและพัฒนาผลิตภัณฑ์ โดยนำเปลือกเลมอนมากลั่นน้ำมันหอมระเหย จากนั้นนำไปผสมกับน้ำเลมอนเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนเข้มข้น โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

3.1.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกเลมอน

1) นำผลเลมอนจำนวน 50 กิโลกรัม ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง แช่สารละลายคลอรีน 100 ppm นาน 10 นาที ปอกเปลือกออก และนำไปใส่ในเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย ขนาด 30 ลิตร
2) กลั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
3) บันทึกปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นในหลอดแก้วที่รองรับทุก 30 นาที จนกว่าปริมาตรน้ำมันหอมระเหยไม่เพิ่มขึ้น
4) คำนวณร้อยละน้ำมันหอมระเหยในแต่ละช่วงเวลาที่น้ำมันหอมระเหยเพิ่มขึ้น (ดัดแปลงจาก Hojjati and Barzegar, 2017)

$$\text{ร้อยละน้ำมันหอมระเหย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (มิลลิลิตร)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

5) วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ ดังนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ

- คุณลักษณะภายนอก ได้แก่ ตะกอนแขวนลอย สี กลิ่น (Gamarra *et al.*, 2006)
- ค่าเฉดสี (Hue angle, H°) และค่าความเข้มสี (Chroma, C*) ด้วยเครื่องวัดสี Minolta camera meter CR-410, Japan

(2) คุณภาพทางเคมี

- ค่าดัชนีการหักเห (AOAC 2016)
- วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย ด้วยเครื่อง Gas Chromatography, GC (ดัดแปลงจาก Gamarra *et al.*, 2006)

3.1.2 การศึกษาวิธีการลดความขมในน้ำเลมอน

1) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการลดความขมของเลมอน เนื่องจากน้ำเลมอนมีสารลิโมนินทำให้มีรสขม โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 วิธีการ ได้แก่ วิธีการลวก วิธีการใช้ตัวดูดซับ คือ เบตาไซโคลเดกซ์ทริน และวิธีการใช้เอนไซม์ วิธีการละ 3 ซ้ำ โดยมีวิธีการเตรียม ดังนี้

<u>วิธีการที่ 1</u> วิธีการลวก

นำผลเลมอนล้างให้สะอาด และลวกน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นปอกเปลือก (วรรณี, 2545) และคั้นน้ำเลมอนด้วยเครื่องคั้นแบบคันโยก นำน้ำเลมอนที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Kashyap and Anand, 2017) บรรจุขณะร้อน และทำให้เย็นทันที

<u>วิธีการที่ 2</u> วิธีการใช้เบตาไซโคลเดกซ์ทริน

นำผลเลมอนล้างให้สะอาด ปอกเปลือกเลมอน คั้นน้ำเลมอนด้วยเครื่องคั้นแบบโยก และกรองจนได้น้ำเลมอน จากนั้นเติมเบตาไซโคลเดกซ์ทรินร้อยละ 0.3 ให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็น (Konno *et al.*, 1981) นำน้ำเลมอนที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Kashyap and Anand, 2017) บรรจุขณะร้อน และทำให้เย็นทันที

<u>วิธีการ 3</u> วิธีการใช้เอนไซม์

นำผลเลมอนล้างให้สะอาด ปอกเปลือกเลมอน คั้นน้ำเลมอนด้วยเครื่องคั้นแบบโยก และกรองจนได้น้ำเลมอน จากนั้นเติมเอนไซม์เพคติเนสปริมาณ 5U/g และเอนไซม์นาริงจิเนส 0.4U/g ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Ni *et al.*, 2014) นำน้ำเลมอนที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Kashyap and Anand, 2017) บรรจุขณะร้อน และทำให้เย็นทันที

2) นำน้ำเลมอนที่ได้จากทั้ง 3 วิธี เปรียบเทียบกับน้ำเลมอนชุดควบคุม โดยวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าเฉดสี (Hue angle, H^{o}) และค่าความเข้มสี (Chroma, C*) ด้วยเครื่องวัดสี Minolta camera meter CR-410, Japan
- ค่าความใส (Clarity) (Ni *et al.*, 2014)

(2) คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณกรดซิตริกทั้งหมด (Total titratable acidity; AOAC, 2016)

- ปริมาณลิโมนิน และนารินจิน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC (Suwanna and Ratiporn, 2009)

(3) คุณภาพทางประสาทสัมผัส

วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้วิธี 7-Point hedonic scale (ไพโรจน์, 2561) ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 50 คน ทดสอบลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ ด้านสี กลิ่น รสเปรี้ยว รสขม และความชอบโดยรวม

3) สรุปผลวิธีการลดความขมของเลมอนที่มีประสิทธิภาพ

3.1.3 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนเข้มข้น

1) การสำรวจข้อมูลของผลิตภัณฑ์

(1) การสำรวจผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ศึกษาผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนที่มีจำหน่ายในท้องตลาด เก็บข้อมูลด้านคุณภาพทางกายภาพ และคุณภาพทางเคมี ข้อมูลด้านราคาของผลิตภัณฑ์ จากนั้นคัดเลือกผลิตภัณฑ์ตัวอย่างเพื่อนำมาใช้อ้างอิง

(2) การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์

สำรวจความต้องการของผู้บริโภคด้วยผู้ทดสอบในร้านโครงการหลวง จำนวน 100 คน โดยสำรวจข้อมูลทั่วไปและพฤติกรรมการบริโภค รวมไปถึงความคิดเห็นเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากน้ำเลมอนเข้มข้นที่ผู้บริโภคต้องการ เพื่อนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์

2) การสำรวจเค้าโครงผลิตภัณฑ์

ก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องทราบข้อมูลเค้าโครงของผลิตภัณฑ์ก่อนเพื่อให้ทราบแนวทางที่ถูกต้องว่ามีลักษณะใดของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญและต้องการให้พัฒนาไปในทิศทางใด การหาเค้าโครงผลิตภัณฑ์ใช้หลักการของ Ideal ratio profile (ไพโรจน์, 2555) เป็นวิธีการทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์เพื่อดูลักษณะของผลิตภัณฑ์ด้วยค่าสัดส่วน โดยใช้สเกลเส้นตรงแบบ Horizontal line scale และให้ผู้ทดสอบเป็นผู้กำหนดลักษณะต่างๆ ด้วยตนเอง ซึ่งลักษณะที่ใช้ในการทดสอบ แบ่งได้เป็น 4 ลักษณะ คือ ลักษณะปรากฏภายนอก กลิ่นและรสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม จากนั้นให้ผู้ทดสอบชิมทำเครื่องหมายลงบนสเกลในตำแหน่งที่เห็นว่าเป็นคุณลักษณะที่เหมาะสมที่สุดของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ (Ideal) และทำอีกเครื่องหมายในตำแหน่งผู้บริโภคเห็นว่าเป็นคุณลักษณะแท้จริงของตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงในการทดสอบ หาค่าสัดส่วนของระยะทางระหว่างตำแหน่งทั้งสอง เพื่อเป็นข้อมูลเค้าโครงผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาในการทดลอง

ต่อไปตามแบบการทดลองของวิธี Ideal ratio profile ซึ่งหากค่าสัดส่วนของลักษณะใดมีค่าเท่ากับ 1 หมายความว่า ตัวอย่างมีลักษณะตามที่ผู้บริโภคต้องการ จึงไม่ต้องทำการพัฒนาต่อไป แต่ถ้าค่าสัดส่วนมีค่าน้อยกว่าหรือมากกว่า 1 หมายความว่า ต้องทำการพัฒนาให้ลักษณะนั้น มีค่ามากขึ้นหรือน้อยลงตามลำดับเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคมากที่สุด ภาพรวมจากค่าสัดส่วนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะนำมาสร้างเป็นกราฟเค้าโครงลักษณะผลิตภัณฑ์รูปใยแมงมุม

ในการทดสอบเค้าโครงผลิตภัณฑ์ของผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนจะใช้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบคือน้ำเลมอนเข้มข้นเป็นตัวอย่างอ้างอิง โดยใช้ผู้ทดสอบชิม จำนวน 15 คน เป็นผู้กำหนดลักษณะต่างๆ ที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ และจะใช้โครงสร้างที่ได้ในขั้นตอนนี้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ตลอดการวิจัย

3) การกลั่นกรองปัจจัยผลิตที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์

เนื่องจากปัจจัยที่ใช้ในการศึกษามี 5 ปัจจัย จึงจำเป็นต้องกลั่นกรองเบื้องต้นให้เหลือเฉพาะปัจจัยหลัก (Main effect) หรือปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตน้ำเลมอนเข้มข้นเท่านั้น โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (ไพโรจน์, 2555) ซึ่งสามารถใช้ปัจจัยให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่มีความสำคัญต่อระบบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีปัจจัยระดับสูง (High level (+)) และระดับต่ำ (Low level (-)) ตามหลักการของ Plackett and Burman Design เมื่อปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรองทั้งหมด 5 ปัจจัย จึงวางแผนการทดลองแบบ N = 8 หน่วยการทดลอง โดย A = น้ำเลมอน B = น้ำเชื่อมฟรุกโตส C = น้ำเปล่า D = เกลือ E = น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกเลมอน ส่วนที่เหลืออีก 2 ตัวจะเป็น Dummy variables คือ F และ G เพื่อใช้ในการหาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error) ของการทดลอง

ตารางที่ 3.1 การวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman

สิ่งทดลอง	ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-

ระดับปัจจัยที่ทำการศึกษาส่วนประกอบของปัจจัยผลิตที่ระดับต่ำ (-) และระดับสูง (+) ดังนี้

ปัจจัย	ระดับต่ำ (-)	ระดับสูง (+)
A = น้ำเลมอน (ร้อยละ)	20	40
B = น้ำเชื่อมฟรุกโตส (ร้อยละ)	40	60
C = กรดแอสคอร์บิค (ร้อยละ)	0.5	1
D = เกลือ (ร้อยละ)	0.2	0.5
E = น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกเลมอน (ร้อยละ)	0.01	0.03

F และ G แทน Dummy variable

โดยสูตรในการคำนวณคือ

$$Effect = \frac{high(E)}{n} - \frac{low(E)}{n}$$

$$S.E.(Effect) = \sqrt{\frac{Ed^2}{n}}$$

$$t - test = \frac{Effect}{S.E.(Effect)}$$

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าเฉดสี (Hue angle, H°) และค่าความเข้มสี (Chroma, C*) ด้วยเครื่องวัดสี Minolta camera meter CR-410, Japan
- ค่าความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer (Bozdogan, 2015)

(2) คุณภาพทางเคมี

- ค่าความเป็นกรดด่าง (AOAC, 2016)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) ด้วยเครื่อง Hand refractometer (AOAC, 2016)
- ปริมาณกรดแอสคอร์บิค (Rekha *et al*., 2012)

(3) คุณภาพทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ Ideal ratio profile (ไพโรจน์, 2555) ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 15 คน ทดสอบลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติเพื่อเลือกเอาปัจจัยทดลองที่มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิต

4) การศึกษาอัตราส่วนของส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม

จากการกลั่นกรองปัจจัยการผลิต ทำให้สามารถกลั่นกรองปัจจัยได้ว่า มีปัจจัยใดบ้างที่มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ หรือเป็นปัจจัยหลักของการผลิต นำปัจจัยหลักที่กลั่นกรองได้มาศึกษารายละเอียด เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^k Factorial experiments in Central Composite Design เมื่อ k คือจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ เช่นเดียวกับข้อที่ 3

3.1.4 การศึกษากระบวนการฆ่าเชื้อในผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม

ศึกษากระบวนการฆ่าเชื้อที่เหมาะสม โดยใช้วิธีการพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial experiments in Central Composite Design with 2 center points ผันแปรเวลาและอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ ดังนี้

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยหลักและระดับที่ต้องการศึกษากระบวนการฆ่าเชื้อ

ปัจจัยหลัก	ระดับต่ำ (-)	ระดับกลาง (0)	ระดับสูง (+)
อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ (องศาเซลเซียส)	80	90	100
เวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที)	15	22.5	30

ตารางที่ 3.3 สิ่งทดลองที่ได้จากการผันแปรอุณหภูมิ และเวลาในการฆ่าเชื้อ

สิ่งทดลอง	รหัส	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1	(1)	-	-
2	a	+	-
3	b	-	+
4	ab	+	+
5	-αa	-1.4142	0
6	+αa	+1.4142	0
7	-αb	0	-1.4142
8	+αb	0	+1.4142
9	Cp1	0	0
10	Cp2	0	0

หมายเหตุ: (1) = ควบคุม a = อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส), b = เวลา (นาที), Cp = จุดกึ่งกลาง

3.1.5 การศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนเข้มข้น

นำผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนที่ผ่านการพัฒนาสูตร และกระบวนการฆ่าเชื้อมาแล้วในข้อที่ 3.1.3 และ 3.1.4 ทำการวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

(1) คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าเฉดสี (Hue angle, H°) และค่าความเข้มสี (Chroma, C*) ด้วยเครื่องวัดสี Minolta camera meter CR-410, Japan
- ค่าความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer (Bozdogan, 2015)

(2) คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณลิโมนิน และนารินจิน ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Suwanna and Ratiporn, 2009)
- ค่าความเป็นกรดด่าง (AOAC, 2016)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) ด้วยเครื่อง Hand refractometer (AOAC, 2016)
- ปริมาณกรดแอสคอร์บิค (Rekha *et al*., 2012)

(3) คุณภาพทางจุลินทรีย์

- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2016)
- ปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2016)
- ปริมาณเชื้อ *E.coli* และเชื้อ *Coliform* (AOAC, 2016)

(4) คุณภาพทางประสาทสัมผัส วิเคราะห์คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ Ideal ratio profile (ไพโรจน์, 2555) ใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 15 คน ทดสอบลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ จากนั้นวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีทางสถิติเพื่อเลือกเอาปัจจัยทดลองที่มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิต

3.1.6 การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนเข้มข้น โดยนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้ ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภค โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ Central Location Testใช้แบบสอบถามเป็นเครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูล แบ่งเป็นข้อมูลทางประชากรศาสตร์ ได้แก่ เพศ อายุ อาชีพ รายได้ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภค ได้แก่ ความถี่ในการรับประทาน วัตถุประสงค์ในการเลือกซื้อและการรับประทาน การบริโภคผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค ระดับความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ ความชอบโดยรวม และการยอมรับผลิตภัณฑ์โดยใช้การทดสอบแบบ 9-Point Hedonic Scale (ไพโรจน์, 2561) โดยระดับคะแนน 1 หมายถึงไม่ชอบมากที่สุด และระดับคะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 100 คน จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมคำนวณทางสถิติหาค่าเฉลี่ยของระดับความชอบผลิตภัณฑ์ด้านต่างๆ การยอมรับในผลิตภัณฑ์และการตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์

3.1.7 การศึกษาต้นทุน และแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำเลมอนเข้มข้นในเชิงพาณิชย์

ศึกษาต้นทุนการผลิตในด้านต้นทุน ส่วนผสม ขั้นตอนการผลิต รวมถึงค่าแรงในแต่ละกระบวนการผลิตน้ำเลมอนเข้มข้น เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์

3.2 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1) กองทุนโครงการโรงงานแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ มูลนิธิโครงการหลวง
2) กองทุนโครงการโรงงานผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพร มูลนิธิโครงการหลวง
3) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่