

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 การสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

3.1.1 ตวงน้ำ-มะพร้าว น้ำหอม 700 มิลลิลิตร ลงในกรวยสกัดขนาด 1,000 มิลลิลิตร และ น้ำมะพร้าวใหญ่ 700 มิลลิลิตร ลงในกรวยสกัดขนาด 1,000 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยเทคนิคการใช้ ตัวทำละลายที่เหมาะสม (Liquid-Liquid Extraction) เริ่มด้วยเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร รวม 3 ครั้ง นำสารสกัดชั้นเฮกเซนที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (Crude hexane Extract)

3.1.2 นำชั้นน้ำจากข้อ 1.1 มาทำการสกัดต่อด้วย เอทิล อะซีเตต (ethyl acetate) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร รวม 3 ครั้ง นำสารสกัดชั้นเอทิล อะซีเตต ที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วย เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเอทิล อะซีเตต (Crude ethyl acetate Extract)

3.1.3 นำชั้นน้ำจากข้อ 1.2 มาทำการสกัดต่อด้วย บิวทานอล (buthanol) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร รวม 3 ครั้ง นำสารสกัดชั้นบิวทานอล ที่ได้ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบ บิวทานอล (Crude buthanol Extract)



ภาพที่ 3.1 ภาพการสกัดมะพร้าว น้ำหอมและมะพร้าวแกง

### 3.2 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH แบบ TLC

3.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เตรียมตัวอย่างน้ำมะพร้าวสกัด 6 ชนิดจากการทดลองที่ข้อที่ 1 และ เตรียมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในสารละลายเมทานอล

3.2.2 เตรียมแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีขนาด 2x5 เซนติเมตร แบ่งจุดที่หยดสารเป็น 4 ส่วน ใช้หลอดคอปิลลารี จุด สารละลายมาตรฐานบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่งที่ 1 และสารสกัดหยบน้ำมะพร้าวชั้นเฮกเซน เอทิล อะซีเตตและ บิวทานอล ตามลำดับ

3.2.3 เตรียมตัวพา (ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (80:20) 5 มิลลิลิตร เกลงในภาชนะที่เตรียมไว้ (chamber) ปิดฝาภาชนะ

3.2.4 จุ่มแผ่น TLC ในภาชนะที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 โดยให้ส่วนของสารที่จุด อยู่เหนือตัวทำละลายในภาชนะ

3.2.5 ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนส่วนที่กำหนดของแผ่น TLC นำแผ่น TLC ขึ้นจากภาชนะที่ใส่โดยใช้คีมคีบ (forcep) ทำเครื่องหมาย ละลายเคลื่อนที่ถึงด้วยดินสอทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน

3.2.6 นำ TLC ที่ได้จากข้อที่ 2.7 มาทำการสเปรย์ ด้วย 0.2 mM DPPH สังเกตการเปลี่ยนแปลง

### 3.3 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์เสริมใยอาหารจากวุ้นสวรรค์

#### 3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

นำน้ำมะพร้าวที่กรองแล้ว 1000 มิลลิลิตร ใส่ในกระทะ จากนั้นใส่น้ำตาลทราย 25 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 3.3 กรัม น้ำส้มสายชู 12 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา ต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที นำไปบรรจุลงขวดแก้วที่ฆ่าเชื้อโดยการแช่ในน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที ปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึงอุณหภูมิห้อง เติมหักเชื้อวุ้น *Acetobacter xylinum* จำนวน 100 มิลลิลิตรในสถานะที่ปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 2-3 วัน เชื้อจะเจริญเติบโต โดยจะสังเกตเห็นแผ่นวุ้นขุ่นๆ เป็นชั้นบางๆ พร้อมใช้งานเพื่อเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

#### 3.3.2 การผลิตวุ้นสวรรค์

นำน้ำมะพร้าวที่กรองแล้ว 1000 มิลลิลิตร ใส่ในกระทะ จากนั้นใส่น้ำตาลทราย 50 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 3.3 กรัม น้ำส้มสายชู 12 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา ต้มจนเดือดเป็นเวลา 15 นาที นำไปบรรจุลงกล่องพลาสติกที่ฆ่าเชื้อโดยการแช่ในน้ำร้อนเป็นเวลา 30 นาที ปิดฝากล่องด้วยผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที รอจนอุณหภูมิของอาหารลดลงถึงอุณหภูมิห้อง เติมหักเชื้อวุ้น 100 มิลลิลิตรในสถานะที่ปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน โดยประมาณ หรือทำการเลี้ยงเชื้อจนกระทั่งอาหารเกือบแห้งจะได้แผ่นวุ้นที่มีความหนาประมาณครึ่งหนึ่งของความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.3.3 การเตรียมวุ้นสวรรค์

ตัดวุ้นสวรรค์ขนาดความกว้าง 5 เซนติเมตร ความยาว 5 เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่วุ้นสวรรค์ในน้ำสะอาดและทำการเปลี่ยนน้ำที่แช่ตัวอย่างทุกวันเพื่อลดความเป็นกรดในวุ้นสวรรค์

### 3.3.4 ขั้นตอนการทำวุ้นสวรรค์แห้ง

#### 3.3.4.1 การวุ้นสวรรค์แห้งด้วยลมร้อน

วางวุ้นสวรรค์ขนาดความกว้าง 5 เซนติเมตร ความยาว 5 เซนติเมตรบนภาตสแตนเลสที่รองด้วยกระดาษไข และนำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 30, 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส อบจนตัวอย่างแห้ง

#### 3.3.4.2 การทำแห้งวุ้นสวรรค์แบบแช่เยือกแข็ง

หั่นวุ้นสวรรค์ให้เป็นลูกเต๋าคขนาด 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนวุ้นสวรรค์แข็งตัว

นำวุ้นสวรรค์ที่แข็งตัวไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยใช้เครื่อง Freeze dryer

### 3.2.5 ขั้นตอนการทำวุ้นสวรรค์แช่อิม (Sweetened Nata De Coco, SDND)

#### 3.2.5.1 การแช่วุ้นสวรรค์ในน้ำเชื่อม

เตรียมโซลิตอลให้ได้ความเข้มข้น 10 - 40°Bx โดยการชั่งโซลิตอล 10, 20, 30 และ 40 กรัม ละลายด้วยน้ำสะอาดและปรับปริมาตรให้ได้ 100 กรัม

เตรียมน้ำตาลทรายให้ได้ความเข้มข้น 10 - 60°Bx โดยการชั่งน้ำตาลทราย 10, 20, 30, 40, 50, และ 60 กรัม ละลายด้วยน้ำสะอาดและปรับปริมาตรให้ได้ 100 กรัม

จากนั้นนำวุ้นสวรรค์ขนาดความยาว 5 เซนติเมตร ความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความหนา 1.5 เซนติเมตร แช่ในน้ำเชื่อมที่ทำจากโซลิตอลหรือน้ำตาลทรายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนำวุ้นสวรรค์ที่ผ่านการแช่แล้วมาอบแห้งโดยใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

#### 3.2.5.1 ขั้นตอนการทำวุ้นสวรรค์แช่คอลลาเจน

ชั่งคอลลาเจน 1, 2, 3 และ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำสะอาดและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำสะอาด จะได้คอลลาเจนความเข้มข้น 1 - 4 %

จากนั้นนำวุ้นสวรรค์ขนาดความยาว 5 เซนติเมตร ความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความหนา 1.5 เซนติเมตร แช่ในคอลลาเจนความเข้มข้นต่างๆที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนำวุ้นสวรรค์ที่ผ่านการแช่แล้วมาอบแห้งโดยใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

### 3.2.6 ขั้นตอนการทำวุ้นสวรรค์แช่อิมอบแห้งผสมคอลลาเจน

#### 3.2.6.1 การเตรียมน้ำเชื่อมผสมคอลลาเจน

ชั่งคอลลาเจน 2 กรัม ละลายด้วยน้ำสะอาดและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำสะอาด จะได้คอลลาเจนความเข้มข้น 2 % จากนั้นชั่งโซลิตอล 40 กรัม และน้ำตาลทราย 50 กรัม ละลายด้วยคอลลาเจน 2 % และปรับปริมาตรให้ได้ 100 กรัม

นำวุ้นสวรรค์ขนาดความยาว 5 เซนติเมตร ความกว้าง 1.5 เซนติเมตร ความหนา 1.5 เซนติเมตร แช่ในน้ำเชื่อมผสมคอลลาเจนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนำวุ้นสวรรค์ที่ผ่านการแช่แล้วมาอบแห้งโดยใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

### 3.2.7 การวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เสริมโยอาหารจากงุ่นสวรรค์

โดยใช้การทดสอบการยอมรับแบบให้คะแนนความชอบ 1 ถึง 5 คะแนนต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี ความหวาน เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และความชอบรวม โดยใช้แบบสอบถามกับผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 15 คน เพื่อหาค่าคะแนนความชอบเฉลี่ย โดยใช้แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสตั้งภาคผนวก ก

## 3.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมี ของผลิตภัณฑ์เสริมโยอาหารจากงุ่นสวรรค์

### 3.4.1 คุณภาพทางด้านกายภาพ

#### 3.4.1.1 การวัดการอุ้มน้ำ

ตัดตัวอย่างที่อบแห้งโดยใช้ลมร้อนและอบแห้งโดยแช่เยือกแข็ง ขนาดความยาว 2 เซนติเมตร x ความกว้าง 1 เซนติเมตร นำตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ละเอียด 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ละเอียด 4 ตำแหน่งจากนั้นนำมาคำนวณเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอุ้มน้ำของงุ่นสวรรค์อบแห้ง

$$\text{การอุ้มน้ำ (\%)} = \frac{ws - wi}{wi} \times 100$$

กำหนดให้ :  $wi$  คือ น้ำหนักเริ่มต้นของงุ่นสวรรค์อบแห้ง

$ws$  คือ น้ำหนักงุ่นสวรรค์อบแห้งหลังการต้มเป็นเวลา 5 นาที

#### 3.4.1.2 วัดด้านเนื้อสัมผัส

วัดค่าเนื้อสัมผัสโดยใช้เครื่อง Texture Analyzer โดยใช้ Cylinder Probe ใช้แรง 1 กิโลนิวตัน วิเคราะห์แบบ Texture Profile Analysis (TPA) วัดออกมาในค่า Hardness และ Springiness

#### 3.4.1.3 วัดสี

วัดค่าสีโดยใช้ระบบ CIE  $L^*a^*b^*$  แสดงผลการวัดค่า  $L^*$  (Lightness) ค่าสี  $a^*$  (Redness) ค่าสี  $b^*$  (yellowness) จากเครื่องวัดสียี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Quest XE จากแหล่งกำเนิด D65 ซึ่งค่า  $L^*$  เป็นค่าความสว่างของสี ค่า  $a^*$  เป็นค่าสีแดงและสีเขียว และค่า  $b^*$  เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน

### 3.4.2 คุณภาพทางด้านเคมี

#### 3.4.2.1 วัดค่าความหวาน

วัดค่าความหวานโดยใช้เครื่อง Refractometer แสดงผลการวัดค่า  $^{\circ}Bx$  คือ หน่วยที่ใช้บอกความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลายโดยการการหดยดสารละลายที่ต้องการทราบค่าบนแผ่นปริซึม ปิดด้วยแผ่นปิด แล้วส่องมองผ่านช่องในที่มืดแสง จะมองเห็นเป็นแถบสี ที่อ่านค่าตัวเลขได้ ตามสเกล ที่เครื่องกำหนดไว้

#### 3.4.2.2 วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนโดยใช้ Lowry method