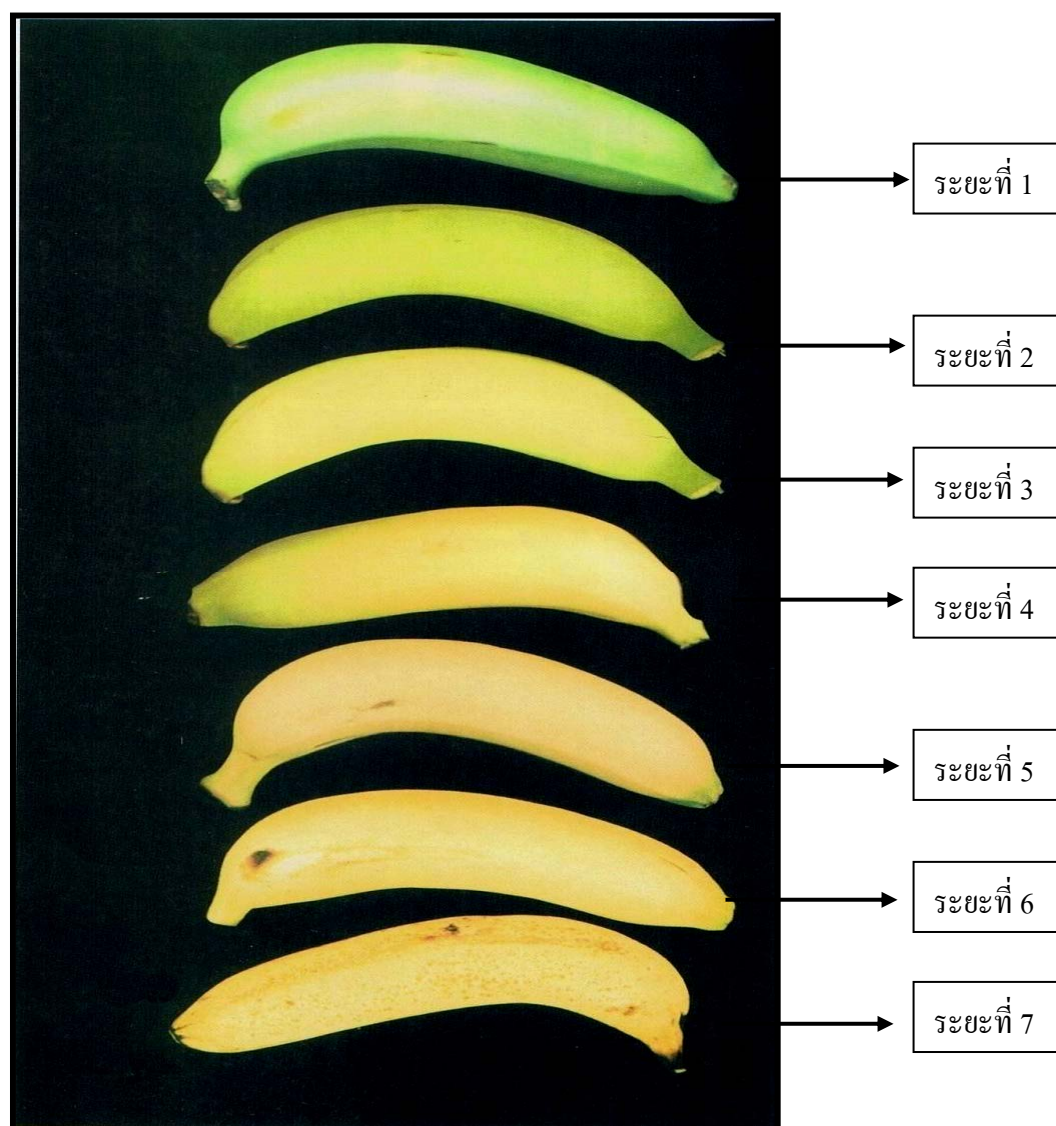


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลักษณะเปลี่ยนแปลงระยะความสุกโดยใช้สีผิวของเปลือกกล้วย เป็นเกณฑ์



ภาพภาคผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสีผิวของเปลือกกล้วยตามระยะการสุก 7 ระยะ
ที่มา: เบญจมาศ (2545)

ภาคผนวก ข
การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

1 ความชื้น (AOAC, 2000 หมายเลข 925.10)

นำกระป๋องอะลูมิเนียม และฝาไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน เดซิเคเตอร์ นำไปชั่งน้ำหนักจนมีค่าแน่นอน ชั่งตัวอย่างแบ่งที่บดละเอียด น้ำหนัก 3 กรัม ลงใน กระป๋องอะลูมิเนียม จดน้ำหนักที่แน่นอน ปิดฝาอบแล้วนำไปอบพร้อมฝาในตู้อบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการปิดฝาแล้วนำมาทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝา คำนวณปริมาณความชื้นดังสมการ

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

2 ปริมาณโปรตีน (Kjeldahl method) (ดัดแปลงจาก AOAC., 2000 หมายเลข 979.09)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยใช้ชุดวิเคราะห์หี้อ Buchi

2.1. สารเคมี

- 2.1.1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- 2.1.2. สารเร่งปฏิกิริยา (ผสมโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 10 กรัมกับ คอปเปอร์ซัลเฟต
- 2.1.3. ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 0.5 กรัม)
- 2.1.4. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 32
- 2.1.5. กรดบอริกร้อยละ 2 เตรียมโดยใช้น้ำร้อน
- 2.1.6. อินดิเคเตอร์ (ผสมเมทิลเรด 0.02 กรัม และ โปรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัมใน เอทานอล 100 มิลลิลิตร)

2.2. วิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5 – 1 กรัม ลงในหลอดย่อยโดยไม่ให้เปื้อนข้างหลอด ใส่สารเร่งปฏิกิริยาและลูกแก้วกันเคঁอด เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20-25 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดยกใส่เตาย่อย ต่อสายชุดจับไอกรด ย่อยจนได้สารละลายใส ยกออกจากเตาย่อยทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร (3 เท่าของกรด) นำไปกลั่น โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 เท่าของกรด หลังเติมเบสสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใช้เวลากลั่น 3 นาที รองรับสิ่งที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุกรดบอริกร้อยละ 2 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ซึ่งหยด อินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด จะได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปไทเทรตกับกรดซัลฟิวริกมาตรฐาน 0.1 นอร์แมล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทา บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ในการไทเทรตนำไปคำนวณร้อยละของไนโตรเจน ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{V \times N \times 14.00}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10}$$

โดย V = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)
 N = ความเข้มข้นของกรดมาตรฐาน (นอร์แมล)
 14.00 = น้ำหนักอะตอมของไนโตรเจน(กรัม)

และคำนวณปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \text{ไนโตรเจน (ร้อยละ)} \times 6.25$$

3 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC (2000) หมายเลข 920.39)

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้ชุดวิเคราะห์หี้อ Tecator รุ่น 1043 Soxtec System HT6 เปิดเครื่องทำน้ำเย็นให้มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส เปิดสวิตช์ให้น้ำไหลเข้าเครื่องสกัดตั้งอุณหภูมิที่เครื่อง thermostatic cut – out เท่ากับ 100 องศาเซลเซียส โดยยังไม่ต้องเปิดสวิตช์หลัก ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนใส่ในทิมเบิล (timble) 5 กรัม โดยรู้น้ำหนักที่แน่นอน เลื่อนปุ่มบังคับทิมเบิลอยู่ในตำแหน่ง boiling นำทิมเบิลใส่ในช่องสกัดแล้วนำที่ใส่ทิมเบิล (timble holder) ออกจากนั้นเลื่อนปุ่มบังคับมาที่ตำแหน่ง rinsing ซึ่งน้ำหนักถ้วยสกัด (extraction cup) ที่ผ่านการ

อบแห้งแล้วเติมแอสไคนลงในถ้วยสกัดประมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำถ้วยสกัดใส่ในช่องสกัดด้วยที่ใส่ถ้วยสกัด (extraction cup holder) แล้วเลื่อนคันโยกทางด้านซ้ายมือของเครื่องสกัดลง เริ่มสกัด โดยเลื่อนปุ่มบังคับทิมเบิ้ลให้อยู่ในตำแหน่ง boiling เปิดก๊อกตัวทำละลาย เปิดสวิตช์หลักที่เครื่อง thermostatic cut-out และตั้งเวลาสกัด 30 นาที เมื่อครบเวลาเลื่อนปุ่มบังคับทิมเบิ้ลให้อยู่ในตำแหน่ง rinsing เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการระเหยตัวทำละลายเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ โดยปิดก๊อกเลื่อนปุ่มระเหย (evaporation) ลง เปิดไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นเลื่อนคันโยกทางด้านซ้ายมือของเครื่องสกัดขึ้น นำถ้วยสกัดออก และใส่ทิมเบิ้ลลงในช่องสกัด เลื่อนปุ่มบังคับไปตำแหน่ง boiling นำทิมเบิ้ลออกจากช่องสกัด และนำถ้วยสกัดไปอบ และใส่ในเคซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนัก เพื่อหาน้ำหนักของไขมันที่สกัดได้ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณไขมัน(ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมันที่สกัดได้} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง}}$$

4 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC (2000) หมายเลข 923.03)

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่เผาและชั่ง น้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปเผาด้วยไฟอ่อน ๆ จนหมดควัน แล้วนำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550± 20 องศาเซลเซียส นาน 2–3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา นำออกมาใส่ในเคซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นเผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุด ถือเป็นน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างที่เผาจนได้น้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักของเถ้าในตัวอย่าง ดังสมการ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{(W2-W3) \times 100}{W2-W1}$$

โดย	W1	คือ	น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (กรัม)
	W2	คือ	น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ และตัวอย่างก่อนอบ
	W3	คือ	น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่และตัวอย่าง หลังอบ (กรัม)

5 การหาปริมาณสตาร์ชที่เกิดความเสียหาย (starch damage)

ใช้ชุดตรวจสอบของบริษัทเมกะไซม์ อินเตอร์เนชันแนล ไอแลนด์ จำกัด (Magazyme International Ireland Ltd.,)

5.1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 5.1.1 หลอดทดลองก้นกลมขนาด 16×100 มิลลิเมตร หรือมีขนาดบรรจุ 12 มิลลิลิตร
- 5.1.2 ไมโครปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร
- 5.1.3 หลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิด ขนาด 1.2, 5 และ 50 มิลลิลิตร
- 5.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (bench centrifuge)
- 5.1.5 เครื่องชั่งแบบละเอียด
- 5.1.6 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectronic 22)
- 5.1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 5.1.8 นาฬิกาจับเวลา

5.2. สารเคมี

5.2.1 รีเอเจนท์

ก) สารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (mM) (Sodium acetate buffer) ในแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เตรียมโดย ปิเปตกรดกลีเซอลิก (glacial acetic acid) 5.7 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าประมาณ 5.0 โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้นเติมแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.74 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในภาชนะบรรจุชนิดซีด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข) กรดซัลฟูริก เจือจาง (H_2SO_4 dilution) ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร ต่อปริมาตร เตรียมโดยปิเปตกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 998 มิลลิลิตร เก็บในอุณหภูมิห้อง

5.2.2 เอนไซม์และสารเคมีในชุดตรวจสอบ

ก) เอนไซม์ฟังกัล แอลฟาเอมิเลส (fungal α -amylase) ละลายเอนไซม์ด้วย สารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ (รีเอเจนท์ ก1)) ให้มีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 มิลลิลิตร ทำให้ สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ระวังการเกิดฟอง และแบ่งเอนไซม์ใส่หลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิด หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิเยือกแข็ง (ประมาณ -20 ถึง -37 องศาเซลเซียส)

ข) เอนไซม์เอมิโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) ทำละลายเอนไซม์ทั้งหมด ด้วยสารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ (รีเอเจนท์ ก1)) ทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ หลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิดสนิท หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิเยือกแข็ง (ประมาณ -20 ถึง -37 องศาเซลเซียส)

ค) สารละลายกลูโคสรีเอเจนท์บัฟเฟอร์ เข้มข้น เตรียมโดยทำละลายรีเอเจนท์ ทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

ง) สารละลายกลูโคส ดีเทอร์มินันซ์ รีเอเจนท์ (glucose determination Reagent, GOPOD reagent) เตรียมโดย ทำละลายรีเอเจนท์ทั้งหมดโดยใช้สารละลายกลูโคสรีเอ เจนท์บัฟเฟอร์ เข้มข้น (ข3)) เก็บในภาชนะปิดสนิทที่ 4 องศาเซลเซียส (เก็บได้ 2-3 เดือน) หรือ -20 องศาเซลเซียส (เก็บได้ 12 เดือน)

จ) สารละลายมาตรฐานของกลูโคส 150 ไมโครกรัม ในกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ร้อยละ 0.2

ฉ) แป้งสาธิตตัวอย่าง ที่ทราบปริมาณสตาร์ชที่เกิดความเสียหายแล้ว

5.3. วิธีการวิเคราะห์

5.3.1 ชั่งตัวอย่างและแป้งสาธิตตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม โดยยอมรับให้มีความ

5.3.2 คลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน ± 10 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองที่สามารถเข้า เครื่องหมุนเหวี่ยงได้ ขนาด 12 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาประมาณ 2-5 นาที

4.3.3 นำหลอดสารละลายเอนไซม์ fungal α -amylase ที่แบ่งไว้มาบ่มในอ่างน้ำ

ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที

4.3.4 เติมสารละลายเอนไซม์ fungal α -amylase ลงในหลอดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง ขณะเติมให้เขย่าแรง ๆ ทันที ใช้เครื่องเขย่า (vertex mix) ใช้เวลาในการเขย่าต่อตัวอย่างประมาณ 5 วินาที จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที โดยจับเวลาตั้งแต่เติมเอนไซม์ลงไปในตัวอย่าง และต้องควบคุมให้ทุกตัวอย่างใช้เวลาในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เท่ากับ 10 นาที

4.3.5 เติมกรดซัลฟูริก เจือจาง 8.0 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วประมาณ 3,000 rpm (ประมาณ 1,000g) เป็นเวลา 5 นาที

4.3.6 ปิเปตส่วนใสด้านบน 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง (ทำ 2 ซ้ำ)

4.3.7 เติมเอนไซม์ amyloglucosidase 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4.3.8 เติมสารละลาย GOPOD 4.0 มิลลิลิตร และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4.3.9 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

หมายเหตุ ในแต่ละชุดของการทดลอง ต้องทำรีเอเจนต์ แบลงค์ (reagent blank) และสารละลายมาตรฐานของกลูโคส 150 ไมโครกรัม ด้วยทุกครั้ง โดย

1. รีเอเจนต์แบลงค์ ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมแอซิเตทบัฟเฟอร์ 0.2 มิลลิลิตรและสารละลาย GOPOD 4.0 มิลลิลิตร
2. สารละลายมาตรฐานกลูโคส ประกอบด้วยสารละลายโซเดียม แอซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 มิลลิลิตร, สารละลายของกลูโคสมาตรฐาน (150 ไมโครกรัม ในกรดเบนโซอิกร้อยละ 0.2) 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย GOPOD 4.0 มิลลิลิตร

5.4. การคำนวณปริมาณสตาร์ชที่เกิดความเสียหาย

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละของปริมาณสตาร์ชที่เกิดความเสียหาย} &= \Delta E \times F \times 90 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times \frac{F}{W} \times 8.1 \end{aligned}$$

เมื่อ ΔE = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ 510 นาโนเมตร

$$W = \frac{162}{180} \times \text{น้ำหนักของตัวอย่างที่เป็นน้ำหนักแห้งในหน่วยมิลลิกรัม}$$

ค่าการเปลี่ยนแปลงจากกลูโคสอิสระ เป็นแอนไฮโดรกลูโคส
เฉพาะที่เกิดขึ้นในส่วนสตาร์ช

6 การหาปริมาณ resistant starch

ใช้ชุดตรวจสอบของบริษัทเมกะไซม์ อินเทอร์เนชันแนล ไอแลนด์ จำกัด (Magazyme International Ireland Ltd.,)

6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

6.1.1. เครื่องบด โดยตัวอย่างที่บดต้องสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มิลลิเมตรได้

6.1.2. เครื่องบด โดยตัวอย่างที่บด ต้องสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 4.5 มิลลิเมตร

6.1.3. เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก

6.1.4. shaking water bath

6.1.5. water bath

6.1.6. vortex mixer

6.1.7. magnetic stirrer

6.1.8. magnetic stirrer bar ขนาด 5×15 มิลลิเมตร

6.1.9. pH meter

6.1.10. นาฬิกาจับเวลา

6.1.11. เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.1 มิลลิเมตร

6.1.12. spectrophotometer

6.1.13. ไมโครปิเปต ขนาด 100 µl.

6.1.14. หลอดทดลองแบบมีฝาปิด (screw cap tube) ขนาด 16×125 มิลลิเมตร

6.1.15. หลอดทดลอง ขนาด 16×100 มิลลิเมตร

6.1.16. lunch box และ plastic rack

6.1.17. Thermometer

6.1.18. volume metric flask ขนาด 100, 200, 500 มิลลิลิตร, 1 และ 2 ลิตร

6.2. สารเคมี

6.2.1. รีเอเจนท์

ก) สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมมาลิเอท ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.0 เตรียมโดย ทำละลายกรดมาลิอิก 23.2 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,600 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 โมลาร์ (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 160 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เติม แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.6 กรัม และ โซเดียมเอไซด์ 0.4 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 2 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บได้นาน 12 เดือน)

ข) สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมแอซิเตท ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ pH 3.8 เตรียมโดย เติมกรดกลูเทอริก 69.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 3.8 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่ อุณหภูมิห้อง และเก็บได้นาน 12 เดือน

ค) สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมแอซิเตท ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 4.5 เตรียมโดย เติมกรดกลูเทอริก 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 4.5 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 2 เดือน

ง) สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียม โดยเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จำนวน 112.2 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ทำให้ละลายเป็นเนื้อ เดียวกัน ละปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

จ) สารละลาย IMS ความเข้มข้นประมาณ 50 % (v/v) เตรียมโดย เจือจางเอทานอล (95% หรือ 99%) หรือ เจือจาง industrial methylated spirits (IMS) จำนวน 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิห้อง ได้มากกว่า 12 เดือน

6.2.2. เอนไซม์ในชุดทดสอบ

ก) สารละลายเข้มข้นแอมิโลกลูโคซิเดส (AMG) จำนวน 12 มิลลิลิตร, 3300 U/mL ใน 50 % กลีเซอรอล

ข) สารละลายเอมิโลกลูโคซิเดส ความเข้มข้น 300 U/ml เตรียมโดยเจือจางสารละลายเข้มข้น เอมิโลกลูโคซิเดส 2 มิลลิลิตร (สารละลายข้อ 5.2.2 ก)) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมมาลิเอท pH 6.0 (สารละลายข้อ 5.2.1 ก)) จำนวน 20 มิลลิลิตร แบ่งลงในหลอดขนาดเล็ก หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บในอุณหภูมิแช่เยือกแข็ง สารละลายที่เตรียมได้จะมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็ง และเก็บได้มากกว่า 5 ปี ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ค) เอนไซม์แพนครีติค แอลฟาเอมิเลส (pancreatic α -amylase) ความเข้มข้น 10 mg/ml เตรียมโดย ทำละลายเอนไซม์ 1 กรัมในสารละลาย โซเดียมมาลิเอท pH 6.0 (ข้อ 5.1.1 ก)) จำนวน 100 มิลลิลิตร และคนเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย AMG (ข้อ 5.2.2 ก)) จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบมากกว่า 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที ใช้ส่วนใสที่อยู่ด้านบน โดยสารละลายนี้เตรียมในวันที่จะทำการทดสอบเท่านั้น

ง) กลูโคสออกซิเดส-เปอร์ออกซิเดส-เอมิโนแอนไทไพรีน (GOPOD) เตรียมโดยทำละลายสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น(ในชุดที่มีให้) ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ใช้บางส่วนของสารละลายนี้ละลายละลาย GOPOD ในชุดที่เป็นสารผสมแห้ง ถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์อยู่ สารละลายนี้จะมีความคงตัว 2-3 เดือน เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ มีความคงตัวมากกว่า 2 ปี เมื่อเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

6.2.3. สารเคมีเพิ่มเติม

ทำละลาย โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ออร์โทฟอสเฟต 136 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 42 กรัม และกรด 4-ไฮดรอกซีเบนโซอิก 30 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1 ลิตร และเติมโซเดียมเอไซด์ 0.4 กรัม ผสมให้เข้ากัน สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้นนี้จะมีความคงตัวมากกว่า 3 ปี เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

6.3. การเตรียมตัวอย่าง

บดตัวอย่างประมาณ 50 กรัม ร่อนผ่านตะแกรงที่มีความละเอียดขนาด 4.5 มิลลิเมตร ตรวจสอบความชื้นของตัวอย่าง ก่อนทำการตรวจสอบปริมาณ resistant starch ตามวิธีของ AOAC หมายเลข 925.10

6.4. การตรวจสอบหาปริมาณ resistant starch

ก) Hydrolysis and solubilisation of non-resistant starch.

- 1) ชั่งตัวอย่างให้มือน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม (+ 5 มิลลิกรัม) ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด พยายามอย่าให้ตัวอย่างติดที่ข้างหลอด
- 2) เติม pancreatic α -amylase ที่มี AMG แล้ว จำนวน 4 มิลลิตร
- 3) ปิดฝาให้แน่น ผสมให้เข้ากันบน vortex mixer
- 4) incubate ตัวอย่างในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีการเขย่าตลอดเวลา (ประมาณ 200 stroke ต่อนาที) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 5) นำหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติมเอทานอล (99%) 4.0 มิลลิลิตร พร้อม ๆ กับเขย่าแรง ๆ บน vortex mixer
- 6) นำหลอดทดลองไปหมุนเหวี่ยง (เปิดฝา) ที่ความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที
- 7) เทส่วนใสด้านบนออกอย่างระมัดระวัง ทำละลายส่วนที่ตกตะกอนอีกครั้งด้วยเอทานอล 50% 2 มิลลิลิตร เขย่า และนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 1,500g เป็นเวลา 10 นาที
- 8) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 7) อีกครั้ง
- 9) เทส่วนใสด้านบนออกอย่างระมัดระวัง คำนวณหลอดทดลองบนกระดาษที่ดูดซับความชื้นได้

ข) วัดปริมาณ resistant starch

- 1) ใส่แท่งแม่เหล็ก และเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จำนวน 2

มิลลิลิตร ทำการเขย่าสารละลายบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็กไฟฟ้า โดยให้ตัวอย่างอยู่ใน lunch box ที่มีน้ำแข็ง และคนเป็นเวลา 20 นาที

2) เติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซิเตท จำนวน 8 มิลลิลิตร ในขณะที่ยังมีการคนอยู่บน magnetic stirrer จากนั้นเติม AMG 0.1 มิลลิลิตรทันที เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทดลองใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำออกมาเขย่าเป็นระยะ

3) ค่อย ๆ ถ่ายเทตัวอย่างในหลอดทดลอง ใส่ใน volumetric flask และนำ magnetic bar ออก ล้างสารละลายในหลอดทดลองออกให้หมด ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาณให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500g เป็นเวลา 10 นาที

4) ดูดสารละลายที่หมุนเหวี่ยง 0.1 มิลลิลิตร (สองครั้ง) ลงในหลอดทดลอง และเติม GOPOD จำนวน 3.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 20 นาที

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ค) Measurement of Non-Resistant (Solubilised) Starch.

1) รวมส่วนใส่ทั้งหมดจากข้อ ก) 7, 8 และ 9 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมแอซิเตท pH 4.5 เขย่าให้เข้ากัน

2) เติมสารละลายเจือจางของแอมิโลกลูโคซิเดส ในสารละลายโซเดียมมาลิเอท pH 6.0 ปริมาตร 10 μ l. บ่มที่ 50 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 20 นาที

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

4) นำค่าต่าง ๆ คำนวณหาปริมาณ resistant starch

ง) การคำนวณหาปริมาณ resistant starch

ปริมาณ resistant starch หาได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณ resistant starch (g/100g sample)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$\text{ปริมาณ resistant starch (g/100g sample)} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90$$

เมื่อ	ΔE	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร
	F	คือ	ค่า factor ของการเปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครกรัมของกลูโคส ในสารละลาย GOPOD
	W	คือ	น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง



ภาพภาคผนวกที่ 2 ลักษณะการคนตัวอย่างใน lunch box ที่บรรจุน้ำแข็งบน magnetic stirrer

7. การคำนวณหาร้อยละการเกิดรีโทรเกรเดชัน

$$\text{ร้อยละการเกิดรีโทรเกรเดชัน} = \frac{\text{ค่าพลังงานการสลายพันธะของการเกิดเจลที่โนเซชัน}}{\text{ค่าพลังงานการสลายพันธะของการเกิดรีโทรเกรเดชัน}} \times 100$$

8. การตรวจวัดความคงทนต่อการคืนรูปจากการแช่เยือกแข็งของแป้งและสตาร์ช โดยวิธีการเหวี่ยงแยก (Centrifugation method) (ดัดแปลงจาก Yuan and Thompson, 1998)

เตรียมสารละลายตัวอย่างแป้ง และสตาร์ชกล้วยที่มีความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก จากการเตรียมเจลที่ได้จากเครื่องวัดความหนืดอย่างรวดเร็ว ถ่ายเจลใส่หลอดเอพเพนดอร์ฟ (Eppendorf tube) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำหนักหลอดรวมกับตัวอย่างก่อนนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำออกมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 8,000g เป็นเวลา 10 นาที แยกน้ำออก และชั่งน้ำหนักหลังจากที่แยกน้ำออกแล้ว ทดลองเช่นนี้เป็นจำนวน 5 ครั้ง และคำนวณหาร้อยละของการบีบน้ำ (%syneresis)

$$\text{การบีบน้ำ (\%)} = ((B-C)/(B-A)) \times 100$$

เมื่อ	A	คือ	น้ำหนักของหลอดเอพเพนดอร์ฟเปล่า
	B	คือ	น้ำหนักของหลอดเอพเพนดอร์ฟที่มีตัวอย่าง
	C	คือ	น้ำหนักของหลอดเอพเพนดอร์ฟที่มีตัวอย่างหลังจากเหวี่ยงแยกน้ำออกไปแล้ว

ภาคผนวก ค

การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

การคำนวณค่าดัชนีความขาว (ดัดแปลงจาก Lee et al., 1999)

ค่าดัชนีความขาวของตัวอย่าง คำนวณได้จาก การนำค่าสีที่วัดโดยระบบ hunter (L, a และ b) มาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ค่าดัชนีความขาว (White index)} = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^2 + b^2}$$

ภาคผนวก ง
การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีเชิงฟิสิกส์

การตรวจคุณภาพทางเคมีเชิงฟิสิกส์

1. ลักษณะความหนืดจากเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว (ดัดแปลงจาก AACC, 2000)

ซึ่งนำหนักแป้งตัวอย่างที่คิดเป็นน้ำหนักแห้งให้มีความเข้มข้นร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 12 ใส่งในกระบอกสำหรับวิเคราะห์ที่มีน้ำหนัก (ที่ได้จากการคำนวณน้ำหนักตัวอย่าง) ประมาณ 25-26 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ ใช้ใบพัดกวนให้แป้งกระจายตัวอย่างรวดเร็ว นำกระบอกใส่เข้าเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว วิเคราะห์ค่าความหนืดตามคู่มือการใช้เครื่อง

สภาวะการตรวจสอบ

อุณหภูมิเริ่มต้น	50 องศาเซลเซียส	เวลานาน 1.0 นาที
อุณหภูมิ	50 – 59 องศาเซลเซียส	เวลานาน 4.0 นาที
อุณหภูมิ	95 องศาเซลเซียส	เวลานาน 5.0 นาที
อุณหภูมิ	95 – 50 องศาเซลเซียส	เวลานาน 4.00 นาที
อุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส	เวลานาน 6.00 นาที
		รวมเวลา 20.00 นาที

เครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ใช้ประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต้องพิจารณาจากความหนืดของผลิตภัณฑ์นั้นขณะให้ความร้อน โดยสามารถเปลี่ยนระดับอุณหภูมิได้อย่างแม่นยำ แนนอน และสามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ การประเมินสมบัติความข้นหนืด (pasting properties) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว สตาร์จะเปลี่ยนไปเป็นเจลมีผลทำให้ความหนืดสูงขึ้น โดยการควบคุมให้อยู่สภาวะอุณหภูมิสูงภายใต้แรงเฉือนค่าหนึ่ง ทำให้ทราบความเสถียรของตัวอย่างที่ทดสอบ หลังจากนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์เย็นตัวลง เพื่อแสดงถึงค่าเซตแบกระหว่างการเปลี่ยนเป็นเจล ค่าที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ได้แก่

ก) ความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) คือ ความหนืดสูงสุดของการเปลี่ยนเป็นลักษณะหนืดขึ้นในช่วงอุณหภูมิเริ่มต้นถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

ข) ความหนืดต่ำสุด (trough) คือ ความหนืดต่ำสุดระหว่างการทำให้เย็น ในช่วงอุณหภูมิ 95- 50 องศาเซลเซียส หน่วยเป็นองศาเซลเซียส

ค) ความหนืดลดลง (break down) คือ ค่าความแตกต่างระหว่างความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด มีหน่วยเป็นเซนติพอยส์

ง) ความหนืดคืนตัว (set back) คือ ความหนืดที่สูงขึ้นหลังจากเบรคดาวน์เนื่องจากอุณหภูมิต่ำลงและโมเลกุลของสตาร์ชเริ่มยึดเหนี่ยวกันแข็งแรงขึ้น ได้จากผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด ,มีหน่วยเป็นเซนติพอยส์

จ) ความหนืดสุดท้าย (final viscosity) คือ ค่าความหนืดสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ มีหน่วยเป็นเซนติพอยส์

ฉ) เวลาเกิดความหนืดสูงสุด (peak time) คือ เวลาที่เกิดความหนืดสูงสุด หน่วยเป็นนาที

ช) อุณหภูมิเริ่มเกิดความหนืด (pasting temperature) คือ อุณหภูมิที่เริ่มมีการเปลี่ยนค่าความหนืด หน่วยเป็นองศาเซลเซียส

2. การวัดกำลังการพองตัว และการละลาย (ดัดแปลงจาก Bello-Perez, 1999)

วิธีทดลอง

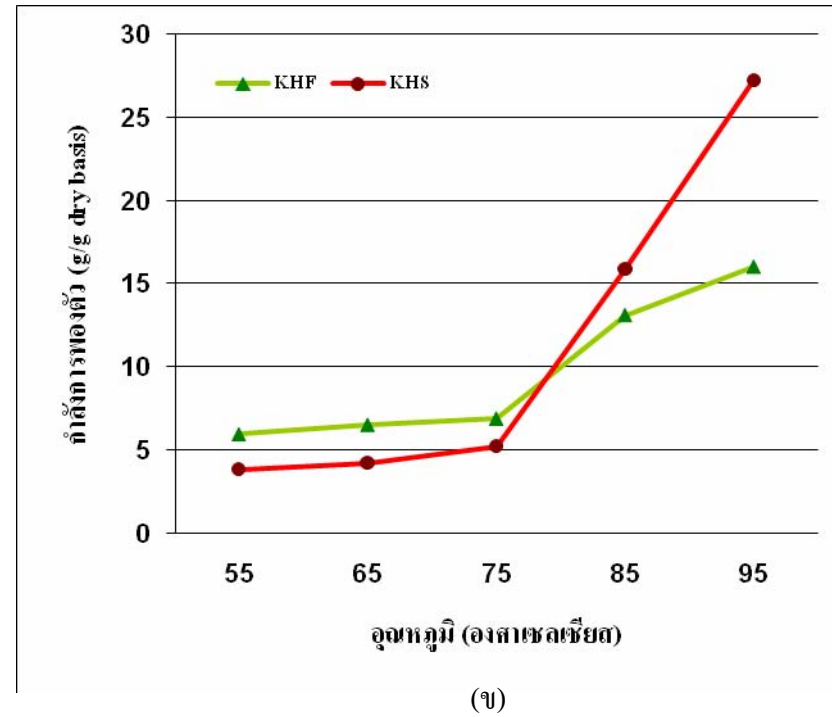
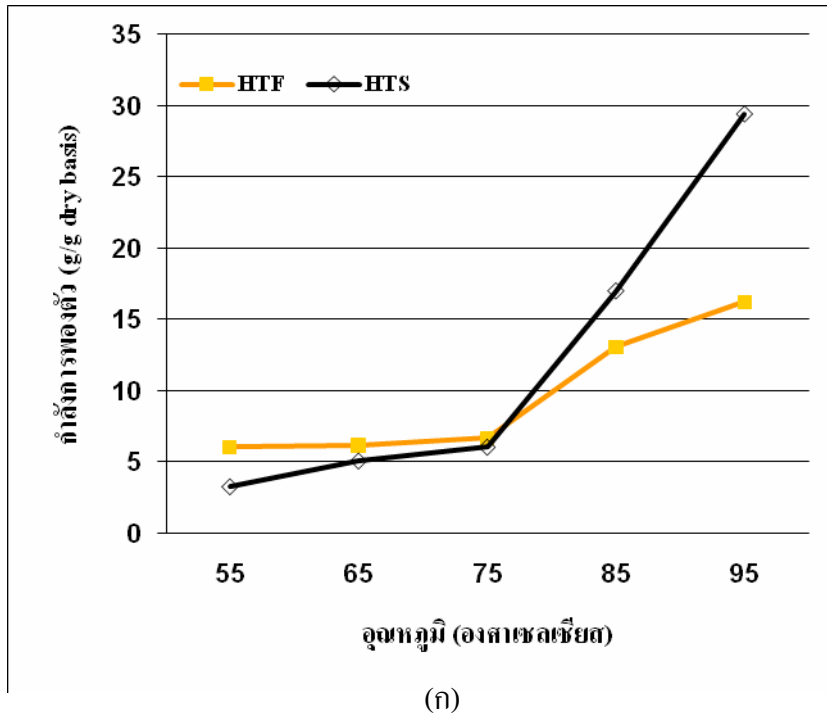
- ก) นำหลอดของเครื่องหมุนเหวี่ยง ล้างทำความสะอาด อบให้แห้ง เก็บใน desiccators
- ข) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ประมาณ 1.000 กรัมลงในหลอดเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ชั่งน้ำหนักแล้ว
- ค) เติมน้ำกลั่น 36 กรัม เข้าให้เข้ากันด้วย vortex mixer
- ง) นำหลอดดังกล่าวแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาเขย่าทุก ๆ 5 นาที

- จ) นำหลอดไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบประมาณ 1,500 g
- ฉ) ใช้ปิเปตดูดส่วนใสด้านบนออกใส่ can อลูมิเนียมที่แห้ง และชั่งน้ำหนักแล้ว
- ช) นำส่วนใสไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- ซ) ทิ้งให้เย็นใน desiccators 1 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก
- ณ) คำนวณหาค่าการละลาย และการพองตัวของตัวอย่าง จากสมการ

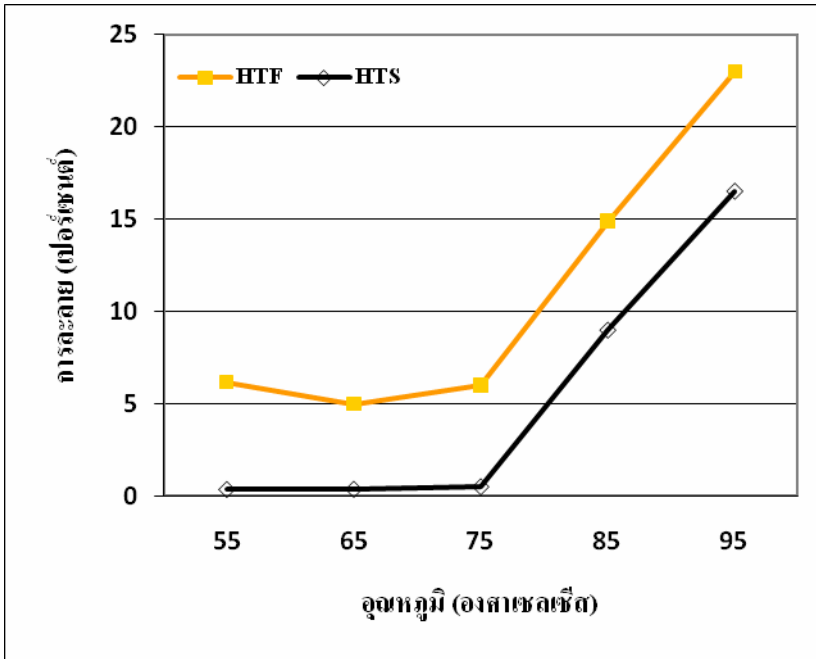
$$\text{ร้อยละการละลาย} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ละลายน้ำ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง}}$$

$$\text{กำลังการพองตัว} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างเปียก} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้ง} \times (100 - \text{ร้อยละการละลาย})}$$

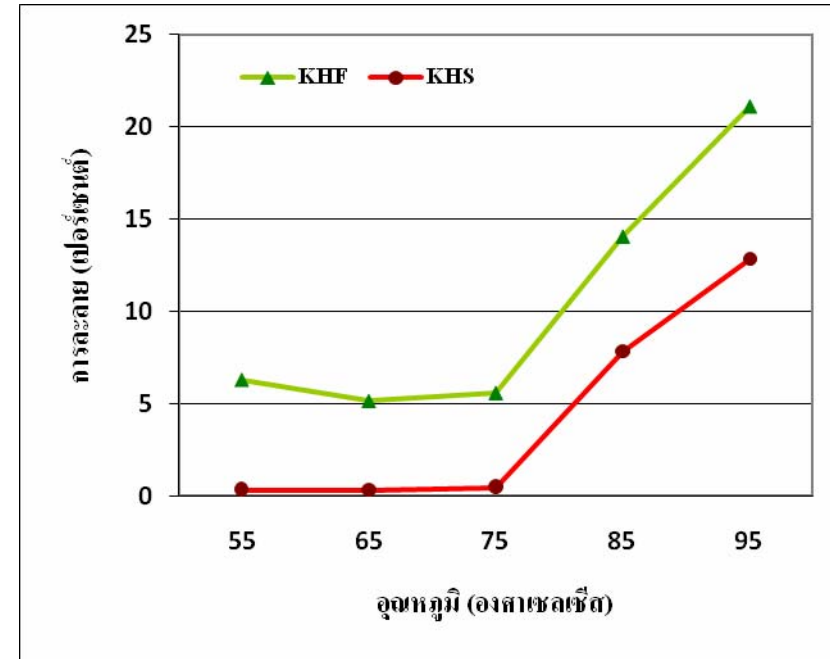
ภาคผนวก จ



ภาพภาคผนวกที่ 3 กำลังการพองตัวของ HTF กับ HTS (ก) และ KHF กับ KHS (ข) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส

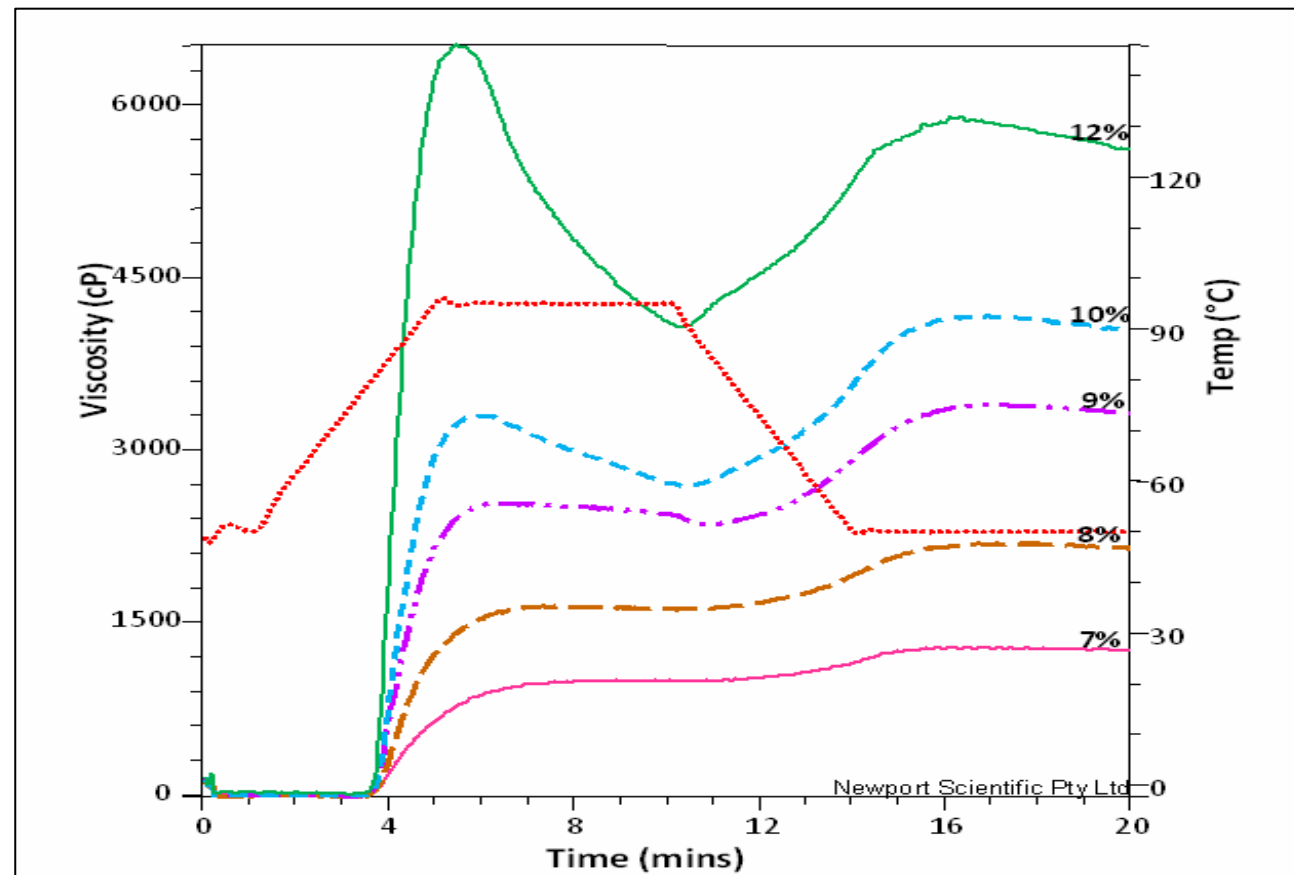


(ก)

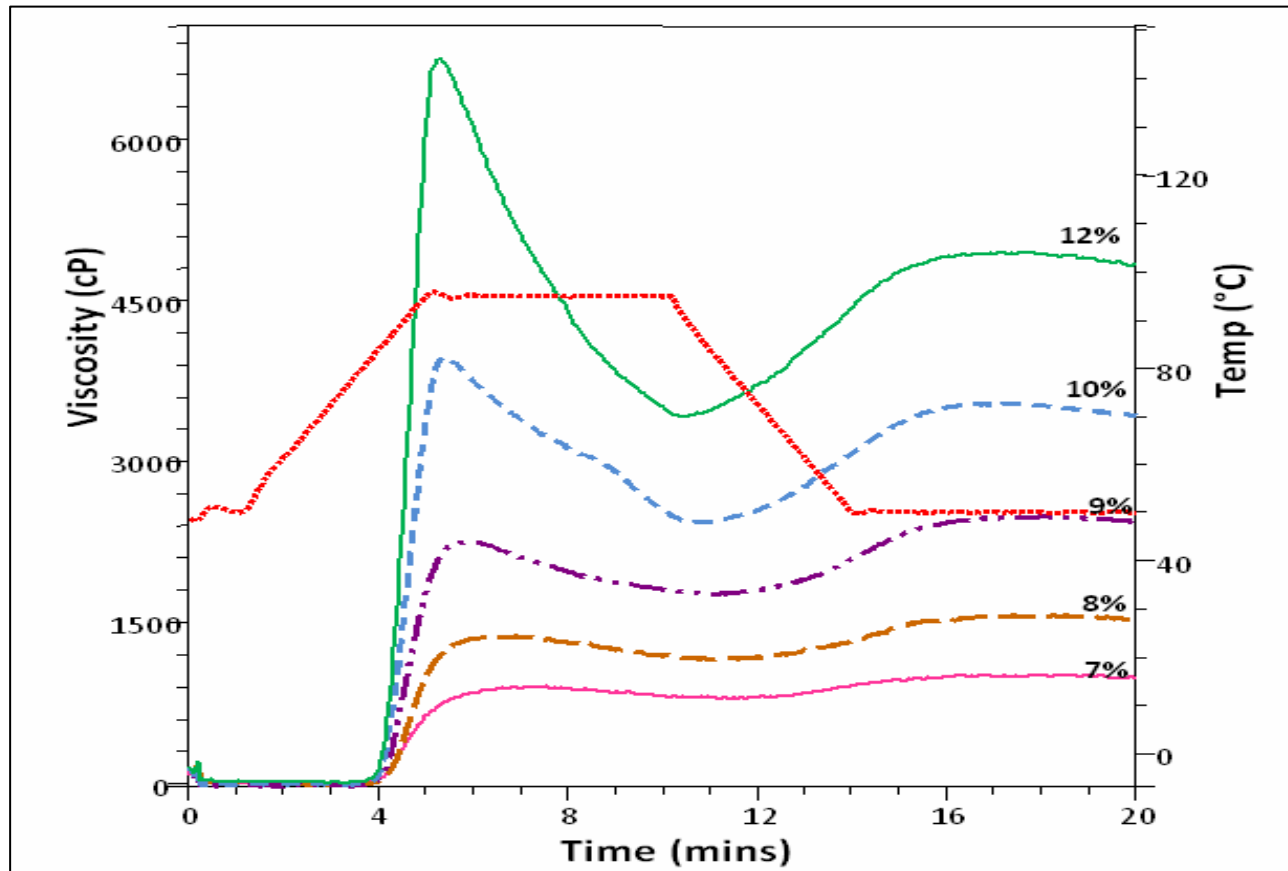


(ข)

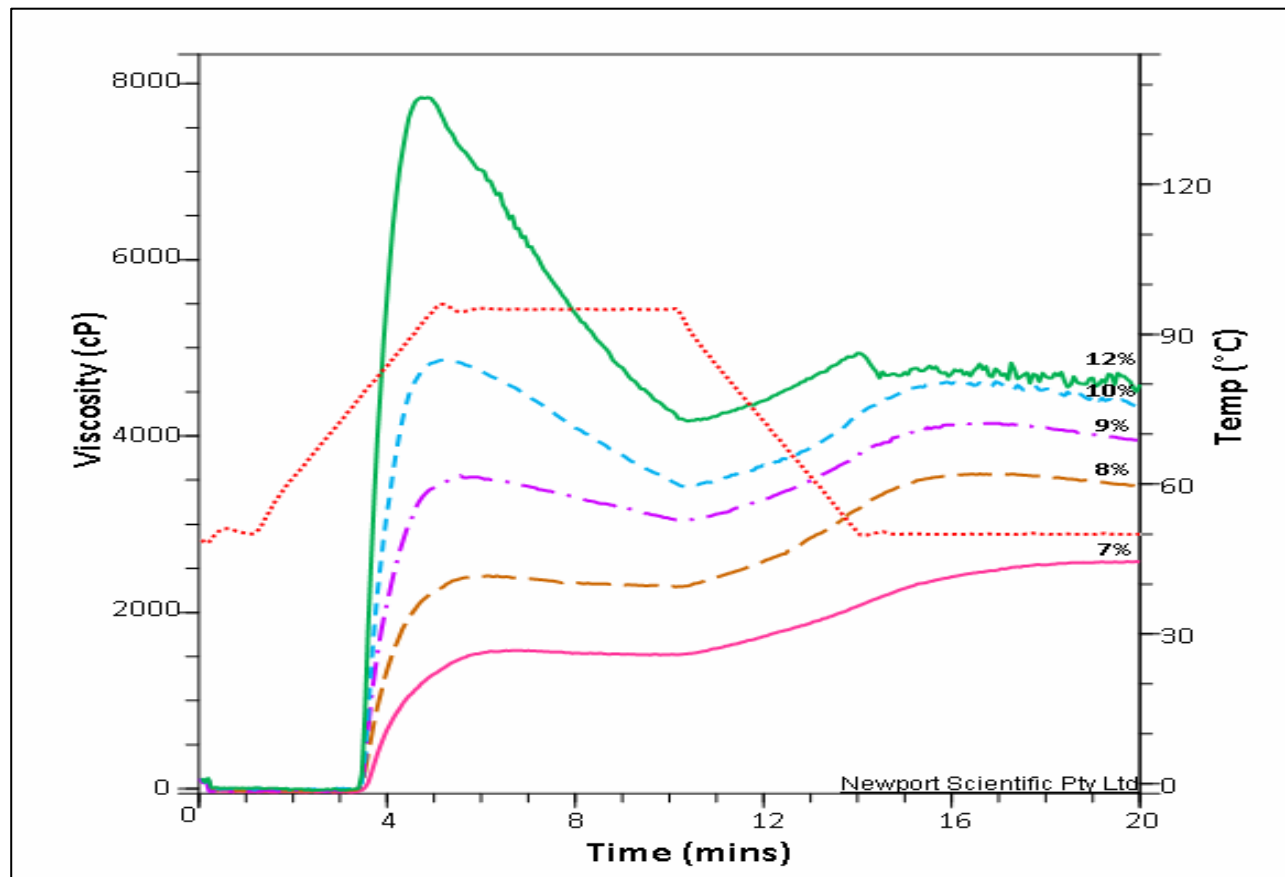
ภาพภาคผนวกที่ 4 กำลังการพองตัวของ HTF กับ HTS (ก) และ KHF กับ KHS (ข) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส



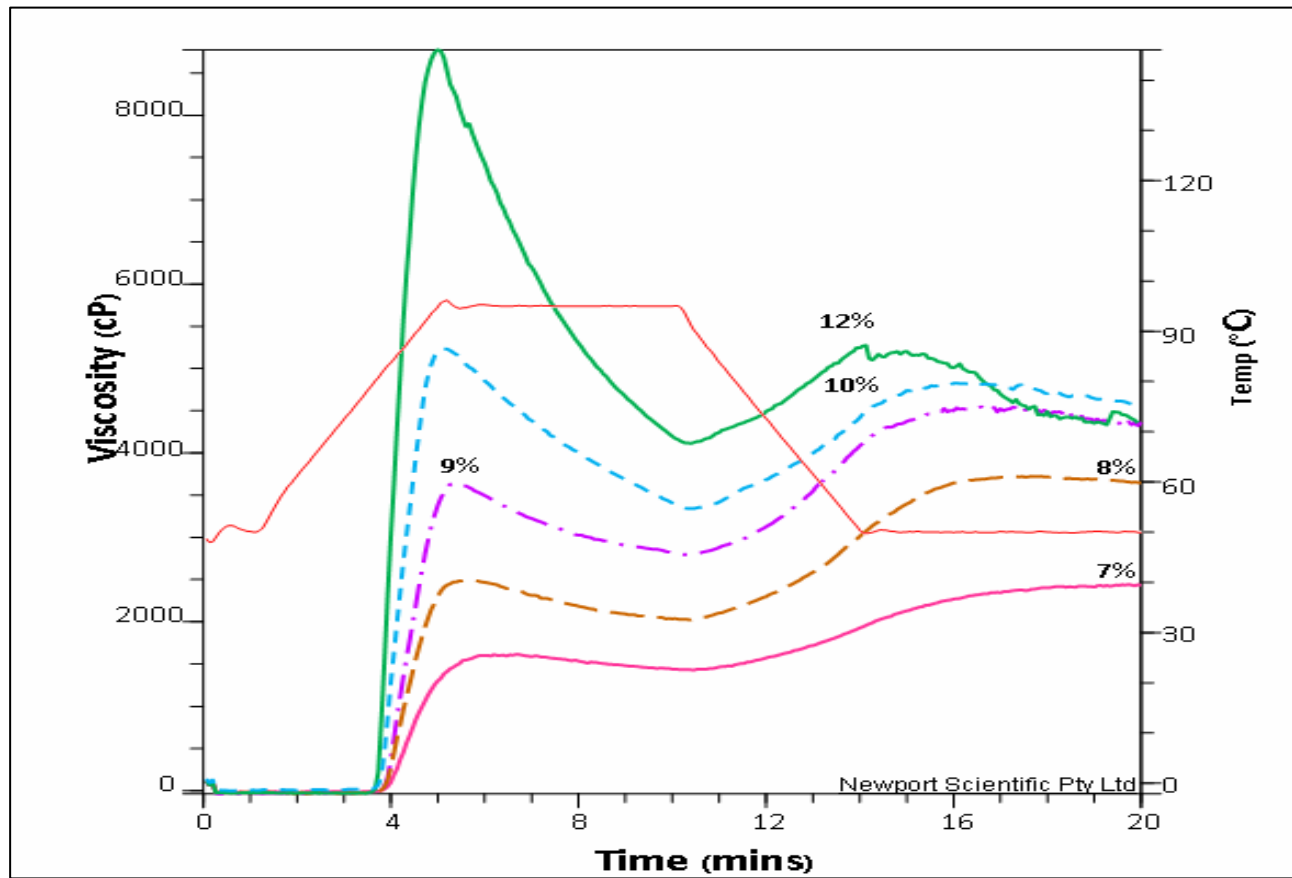
ภาพภาคผนวกที่ 5 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 12 ของ HTF



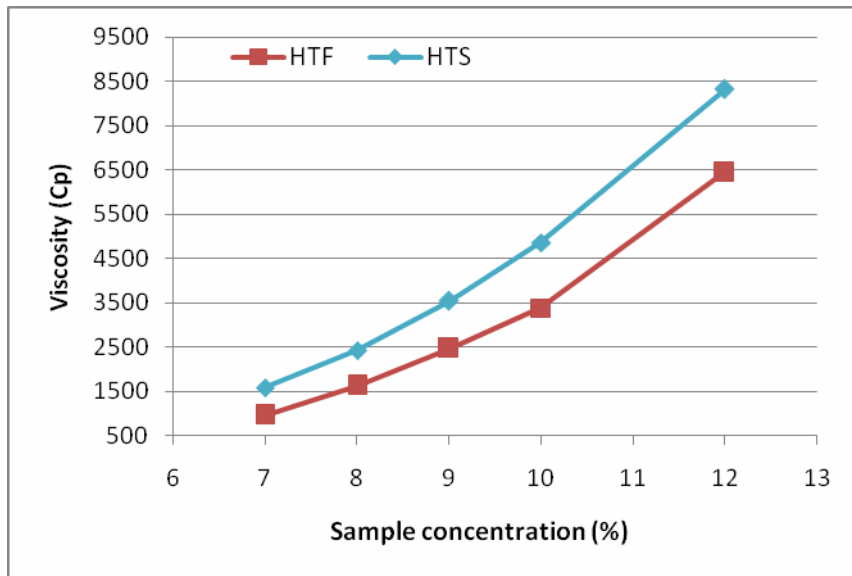
ภาพภาคผนวกที่ 6 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 12 ของKHF



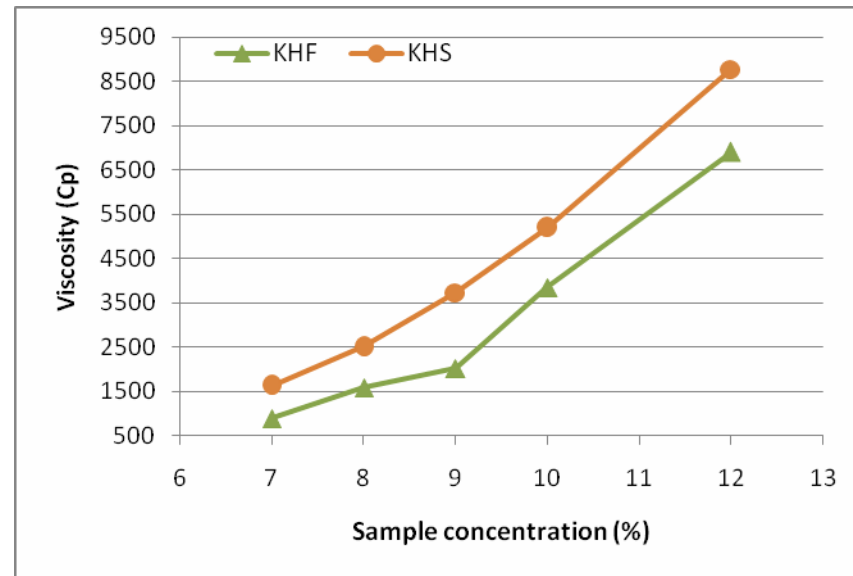
ภาพภาคผนวกที่ 7 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 12 ของ HTS



ภาพภาคผนวกที่ 8 แผนภูมิการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความหนืดแบบรวดเร็ว ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างร้อยละ 7, 8, 9, 10 และ 12 ของKHS

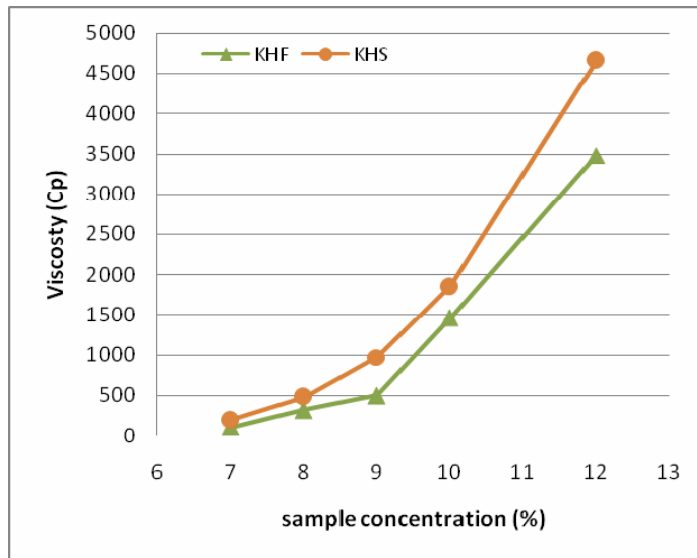


(ก)

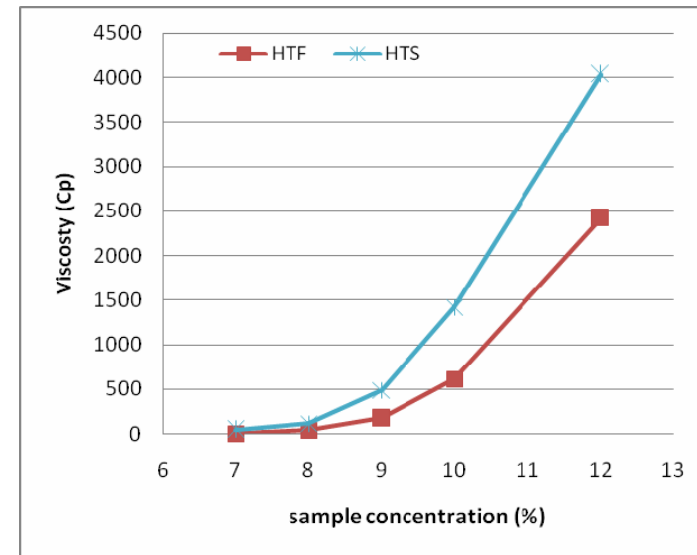


(ข)

ภาพภาคผนวกที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าความหนืดสูงสุดของตัวอย่าง HTF กับ HTS (ก) และ KHF กับ KHS (ข)



(ก)



(ข)

ภาพภาคผนวกที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าความหนืดลดลงของตัวอย่าง HTF กับ HTS (ก) และ KHF กับ KHS (ข)

