บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย คือ สตาร์ชถั่วมะแฮะ (pigeon pea starch) *Cajanus cajan* (L.) สายพันธุ์เมล็ดสีครีม จากจังหวัดน่าน ซึ่งวิธีที่ใช้สกัดสตาร์ชถั่วมะแฮะดัดแปลงมาจาก Agunbiade และ Longe (1999) โดยเริ่มจากแช่ถั่วมะแฮะทั้งเปลือกในน้ำ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 °C อัตราส่วนของถั่วมะแฮะแห้งต่อน้ำเท่ากับ 1:3 (w/w) จากนั้นเทน้ำทิ้ง แล้วนำไปล้างน้ำซึ่งใช้อัตราส่วนของถั่วมะแฮะต่อน้ำเท่ากับ 1:1 (w/w) เทน้ำทิ้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 15 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดเป็นสตาร์ชธรรมชาติ (native starch) โดยนำถั่วมะแฮะที่ผ่านกระบวนการข้างต้นไปสีเอาเปลือกออก ล้างน้ำ 2 ครั้ง แล้วแช่ถั่วมะแฮะในน้ำนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 °C อัตราส่วนของถั่วมะแฮะแห้งต่อน้ำเท่ากับ 1:3 (w/w) เทน้ำทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นผสมถั่วมะแฮะแห้งกับน้ำในอัตราส่วน 1:5 (w/w) นำไปโม่เปียกด้วยเครื่อง stone mill แบบ vertical 2 รอบ นำน้ำแป้งกรองผ่านตะแกรง 50 mesh เพื่อแยกกากทิ้งไป เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้แป้งตกตะกอน แล้วเทน้ำที่แยกชั้นทิ้งไป นำตะกอนแป้งมาปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N แล้วแช่ไว้ในสารละลายด่างที่อุณหภูมิ 5 °C นาน 2 ชั่วโมง เมื่อแป้งตกตะกอนให้เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง นำส่วนที่เป็นตะกอนมาล้างน้ำ 2 ครั้ง ซึ่งใช้อัตราส่วนของตะกอนแป้งต่อน้ำเท่ากับ 1:1 (w/w) แล้วปรับความเป็นกรดด่างของสารแขวนลอยแป้งในน้ำล้างสุดท้ายให้เท่ากับ 7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 N จากนั้นทิ้งแป้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 5 °C นำตะกอนแป้งที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 45 °C นาน 15 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง stone mill แบบ vertical แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh บรรจุสตาร์ชที่ร่อนแล้วลงในถุงซิปพลาสติกชนิดโพลิเอทิลีน แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ซิลิการเจล (silica gel) เป็นสารดูดความชื้น เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชถั่วมะแฮะ

3.2.1.1 ปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.03 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.1)

3.2.1.2 ปริมาณโปรตีน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.22 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.2)

3.2.1.3 ปริมาณเถ้า ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.05 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.3)

3.2.1.4 ปริมาณไขมัน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.13 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.4)

3.2.1.5 ปริมาณเส้นใยหยาบ ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.15 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.5)

3.2.1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต คำนวณจากผลต่าง โดยนำองค์ประกอบอื่น ๆ หักออกจาก 100 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.6)

3.2.1.7 ปริมาณแอมิโลส ดัดแปลงจากวิธีของ Juliano (1971) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.7)

วิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชถั่วมะแฮะ

3.2.2.1 ค่าสี (L, a, b) โดยใช้เครื่อง Chroma meter (Minolta รุ่น CR-300 series, Japan) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.8) และหาค่าดัชนีความขาว (white index) จากสมการ (3.1) (Chen, Lu และ Lii, 1999)

$$\text{ค่าดัชนีความขาว} = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^2 + b^2} \qquad (3.1)$$

3.2.2.2 รูปร่าง และพื้นผิวของสตาร์ชถั่วมะแฮะโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL รุ่น JSM-5800 LV, Japan) ตามวิธีของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.9)

3.2.2.3 ลักษณะ Birefringence โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH30RF200, Japan) และแผ่นฟิล์มโพลารอยด์บิดระนาบแสง (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.10)

3.2.2.4 รูปแบบของโครงสร้างผลึกของเม็ดสตาร์ช และวิเคราะห์ pattern โดยใช้เครื่อง X-ray diffractometer (Bruker รุ่น D8-Discover, Germany) ดัดแปลงจากวิธีของ Zobel (1964a) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.11)

3.2.2.5 ขนาด และการกระจายขนาดของสตาร์ชถั่วมะแฮะโดยใช้เครื่อง Multi-wavelength Particle Size Analyzer with Tornado (Dry Powder Module) System (Beckman Coulter รุ่น LS 13 320, USA) ตามวิธีของ Beckman coulter (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก. 12)

3.2.2.6 ความสามารถในการจับน้ำ (Water binding capacity) ดัดแปลงจากวิธีของ Medcalf และ Gilles (1965) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.13)

3.2.2.7 กำลังการพองตัว และการละลาย ดัดแปลงจากวิธีของ Schoch (1964)(รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.14)

3.2.2.8 จลนศาสตร์การขยายขนาดของเม็ดสตาร์ช (Starch granule growth kinetics) ดัดแปลงจากวิธีของ Tattiyakul (1997) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.15)

3.2.2.9 สมบัติด้านความหนืดโดยใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer (Newport Scientific รุ่น RVA-4, Australia) ดัดแปลงจากวิธีของ Norbert, Mintus และ Detmold (1995) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.16)

3.2.2.10 สมบัติด้านความร้อน โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (Netzsch รุ่น 204 F1 Phoenix, Germany) ดัดแปลงจากวิธีของ Kim และคณะ (1995) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.17)

3.2.2.11 สมบัติทางการไหล โดยใช้เครื่อง Rheometer (Bohlin Instrument รุ่น CVOR 150, UK) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.18)

วิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.2.3 การศึกษาผลของขนาดเม็ดสตาร์ชต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

จำแนกขนาดของเม็ดสตาร์ชออกเป็น 4 ขนาด โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bhunia และ Ghangrekar (2007) (รูปที่ 3.1) ซึ่งเป็นวิธีการแยกขนาดเม็ดสตาร์ชโดยอาศัยความแตกต่างของเวลาการตกตะกอนในน้ำ โดยการเตรียมสารละลายสตาร์ชในอัตราส่วนสตาร์ช:น้ำ เท่ากับ 1:25 (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลายสตาร์ชที่เตรียมแล้วลงในบิวเรตต์ขนาด 50

มิลลิลิตร จับเวลาในการตกตะกอน แล้วไขสารละลายสตาร์ชออกจากบิวเรตต์ทุก ๆ 15, 30, 60 และมากกว่า 60 นาที นำสารละลายสตาร์ชที่แยกได้ในแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Thermo IEC รุ่น IEC Multi RF, USA) ที่ความเร็ว 5,000 × g นาน 10 นาที อบสตาร์ชให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Heraeus รุ่น ST 5042, Germany) ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 16 ชั่วโมง แล้วร่อนสตาร์ชที่ได้ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 mesh เก็บสตาร์ชที่ร่อนแล้วทั้ง 4 ขนาด ลงในถุงซิปพลาสติกชนิดโพลิเอทิลีน แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ซิลิการเจลเป็นสารดูดความชื้น เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

ผสมสตาร์ชกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนสตาร์ช:น้ำ เท่ากับ 1:25 (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

เทสารละลายสตาร์ชลงในบิวเรตต์

↓

ไขสารละลายสตาร์ชออกจากบิวเรตต์ทุก ๆ 15, 30, 60 และ มากกว่า 60 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยงสารละลายสตาร์ชที่แยกได้ในแต่ละช่วงเวลาที่ความเร็ว 5,000 × g
อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 นาที

↓

อบสตาร์ชด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 16 ชั่วโมง

↓

ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 mesh

↓

สตาร์ชถั่วมะแฮะ 4 ขนาด

รูปที่ 3.1 วิธีการจำแนกขนาดสตาร์ชถั่วมะแฮะออกเป็น 4 ขนาด
ที่มา: ดัดแปลงจากวิธีของ Bhunia และ Ghangrekar (2007)

3.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสของสตาร์ชถั่วมะแฮะที่ผ่านการแยกขนาดแล้วเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.7

3.2.3.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชถั่วมะแฮะที่ผ่านการแยกขนาดแล้วเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS