

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ผลิตเส้นใยอาหาร (Dietary fiber; DF) จากผลไม้ 2 ชนิดคือ มะม่วง และฝรั่งโดยใช้กรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน 4 วิธีคือ 1) การผลิตเส้นใยอาหารแบบสด 2) การผลิตเส้นใยอาหารโดยทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาด 3) การผลิตเส้นใยอาหารโดยทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 4) การผลิตโดยทำให้เส้นใยอาหารเหลือเฉพาะส่วนของของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และไม่ผ่านการทำแห้ง จากนั้นศึกษาคุณลักษณะทางเคมี และเคมีกายภาพของเส้นใยอาหารที่ผลิตได้รวมทั้งศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่ได้จากแหล่ง และวิธีการผลิตที่แตกต่างกันต่อคุณสมบัติต่างๆ ของแป้งข้าวเจ้า ได้แก่ คุณสมบัติทางความร้อน การเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะร้อน คุณสมบัติด้านรีโอโรยี และการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้า โดยมีแนวทางในการดำเนินการวิจัย 6 ขั้นตอน ดังนี้

1. การตั้งสมมุติฐาน
2. การสร้างแผนการวิจัย
3. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง
4. วิธีการทดลอง

การศึกษานี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

- 4.1 การทดลองตอนที่ 1 : การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน
 - 4.2 การทดลองตอนที่ 2 : การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ผลิตจากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกันต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเจ้า
 - 4.3 การทดลองตอนที่ 3 : การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งต่อการถูกย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้า
5. การเก็บรวบรวมข้อมูล
 6. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การตั้งสมมุติฐาน

จากการตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าแหล่งและกระบวนการผลิตเส้นใยอาหารที่มีความแตกต่างกันมีผลต่อคุณลักษณะทางเคมี และกายภาพ ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของเส้นใยอาหารนั้นๆ ดังนั้นสมมุติฐานของงานวิจัยคือ เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตเส้นใยอาหารแบบสด (Fresh mango dietary fiber; FMDF, และ Fresh guava dietary fiber; FGDF ตามลำดับ) เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Tray-dried mango dietary fiber; TMDF, และ Tray-dried guava dietary fiber; TGDF ตามลำดับ) เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried mango dietary fiber; FDMDF, และ Freeze-dried guava dietary fiber;

FDGDF ตามลำดับ) และเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำให้เส้นใยอาหารเหลือเฉพาะส่วนของของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และไม่ผ่านการทำแห้ง (Alcohol insoluble solid mango dietary fiber; AMDF, และ Alcohol insoluble solid guava dietary fiber; AGDF ตามลำดับ) มีคุณลักษณะทางเคมี และกายภาพแตกต่างกัน และเมื่อนำไปเติมในแป้งข้าวเจ้าเส้นใยอาหารเหล่านี้ส่งผลให้คุณสมบัติทางความร้อน การเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะร้อน คุณสมบัติด้านรีโอโลยี และการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้าแตกต่างกัน

3.2 แผนการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research design) ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองตอนที่ 1: การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างอย่างสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาคือกรรมวิธีการในการผลิตเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่ง 4 วิธี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การทดลองตอนที่ 2: การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่ผลิตจากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกันต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเจ้า ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะให้ความร้อน คุณสมบัติทางความร้อน และคุณสมบัติด้านรีโอโลยี วางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างอย่างสมบูรณ์ จัดการทดลองแบบ 4×4 แฟคทอเรียล (4×4 Factorial in CRD) โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ กรรมวิธีการในการผลิตเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่ง 4 วิธี และความเข้มข้นของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่เติมลงในแป้งข้าวเจ้า 4 ความเข้มข้น (ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, และ 7.5) ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ

การทดลองตอนที่ 3: การศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วง และฝรั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้า วางแผนการทดลองแบบสุ่มตัวอย่างอย่างสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) โดยมีปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่เติมลงในแป้งข้าวเจ้า 4 ความเข้มข้นได้แก่ ร้อยละ 0, 2.5, 5.0, และ 7.5 ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ

3.3 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 วัสดุดิบ

3.3.1.1 ผลไม้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่

1) มะม่วงสายพันธุ์แก้วเขียว (*Mangifera indica* L.) จากจังหวัดยโสธร เก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน-พฤษภาคม อายุการเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 2-3 เดือน โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) เฉลี่ยเท่ากับ 8.27 องศาบริกซ์ และปริมาณกรดทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 1.71 ของกรดซิตริก

2) ฝรั่งสายพันธุ์แป้นสีทอง (*Psidium guajava* L.) จากจังหวัดนครปฐม เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม อายุการเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 4-5 เดือน โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 8.80 องศาบริกซ์ และปริมาณกรดทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 0.43 ของกรดซิตริก

3.3.2.2 แป้งข้าวเจ้า ได้แก่ ข้าวเจ้าสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

3.3.2.1 เครื่องแก้วต่างๆ (Pyrex, Germany)

3.3.2.2 เครื่องชั่งละเอียด (Presica 25A, Switzerland)

3.3.2.3 ตู้อบแบบถาด (Tray-dryer), (B.W.S.Trading, Ltd. Partnership, Thailand)

3.3.2.4 เครื่องบ่มแบบเขย่า (Model LSI-1005R, Lab Tech, Koral)

3.3.2.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert Schutzart, Germany)

3.3.2.6 เครื่อง pH meter (Mettler Toledo SevenEasy, USA)

3.3.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Universal 320R, Germany)

3.3.2.8 เครื่อง Vortex mixer (Hamony, Japan)

3.3.2.9 เครื่อง UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)

3.3.2.10 เครื่องวิเคราะห์ไขมันแบบชอกท์เลท (Buchi E-816, Switzerland)

3.3.2.11 เครื่องกวนและแท่งแม่เหล็กสำหรับกวน (Kitchenaid, USA)

3.3.2.12 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (PL 3000, Heto, USA)

3.3.2.13 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven), (Binder, Germany)

3.3.2.14 เครื่องย่อยโปรตีน และชุดวิเคราะห์กลั่นโปรตีน (Gerhardt, Germany)

3.3.2.15 เครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พร้อมแคน (can) และพาย (Newport Scientific, Sydney, Australia)

3.3.2.16 เครื่อง Rheometer (AR 2000 ex, TA Instrument, USA)

3.3.2.17 เครื่อง Differential scanning calorimeter (Q200, TA Instrument, USA)

3.3.3 สารเคมี

3.3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

1) เอทานอล (Ethanol), (Ajax Finechem, Australia & New Zealand)

2) อะซิโตน (Acetone), (J.T. Baker, Thailand)

3.3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน

1) กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid), (Fluka, Germany)

2) โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate), (Univar, Australia)

3) คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate), (Analar, England)

4) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid), (J.T. Baker, Thailand)

5) กรดบอริก (Boric acid), (Rankem, India)

- 3.3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไขมัน
- 1) ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether), (Rci labscan, Thailand)
- 3.3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด
- 1) ชุดวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดของ Megazyme (K-TSTA 07/11)
- 3.3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เส้นใยอาหาร
- 1) ชุดวิเคราะห์เส้นใยอาหารทั้งหมดของ Megazyme (K-TDFR 07/11)
- 3.3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
- 1) เมทานอล (Methanol), (Ajax Finechem, Australia & New Zealand)
 - 2) เอทานอล (Ethanol), (Ajax Finechem, Australia & New Zealand)
 - 3) รีเอเจนต์ Folin-ciocalteu (Sigma, Germany)
 - 4) 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (TPTZ) solution
 - 5) ไอรอน (III) คลอไรด์ (Iron (III) chloride)
 - 6) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (Sigma, Germany)
 - 7) กรดแกลลิก (Gallic acid), (Fluka, Germany)
- 3.3.3.7 เอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การย่อยได้ของแป้ง
- 1) แอลฟา-อะไมเลส (Thermostable α -amylase) (Megazyme, Ireland)
 - 2) อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) (Megazyme, Ireland)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การผลิตเส้นใยอาหาร

กรรมวิธีการผลิตเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งมีทั้งสิ้น 4 วิธี ดังนี้

3.4.1.1 การผลิตเส้นใยอาหารแบบสด

นำมะม่วงหรือฝรั่งล้างด้วยน้ำสะอาด หั่น และสับให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร คั้นแยกน้ำออก แล้วล้างกากผลไม้ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วนผลไม้ 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน และแยกน้ำออกด้วยวิธีการกรองผ่านผ้าขาวบาง โดยทำการล้างทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง ร่อนผ่านตะแกรกร่อนขนาด 12 เมช จากนั้นนำเส้นใยอาหารแบบสด (Fresh mango dietary fiber; FMDF และ Fresh guava dietary fiber; FGDF) ที่ได้ไปบรรจุแบบสุญญากาศในถุงอะลูมิเนียม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การผลิตโดยไม่ผ่านการทำให้เส้นใยอาหารบริสุทธิ์ และทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาด (ดัดแปลงจาก Chantaro *et al.*, 2008)

นำมะม่วงหรือฝรั่งล้างด้วยน้ำสะอาด หั่น และสับให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร คั้นแยกน้ำออก แล้วล้างกากผลไม้ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วนผลไม้ 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน และแยกน้ำออกด้วยวิธีการกรองผ่านผ้าขาวบาง โดยทำการล้างทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบถาด (Laboratory tray dryer) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปริมาณความชื้นเหลือน้อยกว่า 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) แล้วปั่นให้ละเอียด

ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 12 เมช จากนั้นนำเส้นอาหารที่ผลิตโดยทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray-dried mango dietary fiber; TMDF และ Tray-dried guava dietary fiber; TGDF) ที่ได้นี้ไปบรรจุแบบสุญญากาศในถุงอะลูมิเนียม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.4.1.3 การผลิตโดยไม่ผ่านการทำให้เส้นใยอาหารบริสุทธิ์และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ดัดแปลงจาก Sun-Walterhouse *et al.*, 2008)

นำมะม่วงหรือฝรั่งล้างด้วยน้ำสะอาด หั่น และสับให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร คั้นแยกน้ำออก แล้วล้างกากผลไม้ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วนผลไม้ 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน และแยกน้ำออกด้วยวิธีการกรองผ่านผ้าขาวบาง โดยทำการล้างทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นนำไปทำให้แห้งแบบระเหิดด้วยเครื่อง Freeze dryer Model PL 3000 (HETO) ปั่นให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 12 เมช จากนั้นนำเส้นใยอาหารที่ผลิตโดยทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-dried mango dietary fiber; FDMDF และ Freeze-dried guava dietary fiber; FDGDF) ที่ได้นี้ไปบรรจุแบบสุญญากาศในถุงอะลูมิเนียม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.4.1.4 การผลิตโดยทำให้เส้นใยอาหารเหลือเฉพาะส่วนของของแข็งที่ไม่ละลาย ในแอลกอฮอล์และไม่ผ่านการทำให้แห้ง (ดัดแปลงจาก Chau and Huang, 2003)

นำมะม่วงหรือฝรั่งล้างด้วยน้ำสะอาด หั่น และสับให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร คั้นแยกน้ำออก แล้วล้างกากผลไม้ด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วนผลไม้ 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน และแยกน้ำออกด้วยวิธีการกรองผ่านผ้าขาวบาง โดยทำการล้างทั้งหมด 5 รอบ จากนั้นปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูง ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 12 เมช นำส่วนกากที่ได้ต้มให้เดือดในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 85 ด้วยอัตราส่วนตัวอย่างต่อเอทานอล 1 ต่อ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 40 นาที ระหว่างนั้นกวนตัวอย่างตลอดเวลา นำส่วนผสมกรองผ่าน แก้วกรอง แล้วล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 จากนั้นระเหยเอทานอลออกด้วยอากาศ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเส้นใยอาหารที่ได้จากผลิตโดยทำให้เส้นใยอาหารเหลือเฉพาะ ส่วนของของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และไม่ผ่านการทำให้แห้ง (Alcohol insoluble solid mango dietary fiber; AMDF และ Alcohol insoluble solid guava dietary fiber; AGDF) ที่ได้นี้ไปบรรจุแบบสุญญากาศในถุงอะลูมิเนียม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.4.2 การทดลองตอนที่ 1: การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของเส้นใยอาหาร จากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน

นำเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน 4 วิธี คือ เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตเส้นใยอาหารแบบสด (FMDF และ FGDF) เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (TMDF และ TGDF) เส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FDMDF และ FDGDF) และเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากการผลิตโดยทำให้เส้นใยอาหารเหลือเฉพาะ ส่วนของของแข็งที่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์และไม่ผ่านการทำให้แห้ง (AMDF และ AGDF) มาศึกษา คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพ ดังนี้

3.4.2.1 คุณสมบัติทางเคมี

1) องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเส้นใย ตรวจวัดโดยใช้วิธีของ AOAC (2000) (ดังภาคผนวก ก.1-ก.4)

2) ปริมาณแป้งทั้งหมด วิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบของ Megazyme (K-TSTA 07/11) (ดั่งภาคผนวก ก.5)

3) ปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ และเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ วิเคราะห์โดยใช้ชุดทดสอบของ Megazyme (K-TDFR 07/11) (ดั่งภาคผนวก ก.6-ก.8)

4) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Iqbal et al., 2005) (ดั่งภาคผนวก ก.9)

5) การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการดักจับอนุมูลอิสระของ DPPH (ดัดแปลงจาก Dasgupta and De, 2004) (ดั่งภาคผนวก ก.9)

6) การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการรีดิวซ์เฟอร์ริก (Fu et al., 2011) (ดั่งภาคผนวก ก.9)

3.4.2.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

1) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Robertson et al., 2000) (ดั่งภาคผนวก ข.1)

2) ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Robertson et al., 2000) (ดั่งภาคผนวก ข.2)

3.4.3 การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่ผลิตจากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกันต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเจ้า

3.4.3.1 คุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะให้ความร้อน (Pasting properties) (ดัดแปลงจากวิธีของ Zhong et al., 2008)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะให้ความร้อนของแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้นร้อยละ 10 เมื่อมีการเติมเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งจากกรรมวิธีการผลิตที่ต่างกัน 4 วิธี ที่ความเข้มข้นของเส้นใยอาหารร้อยละ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 โดยใช้เครื่อง RVA Model RVA 3C (Newport Scientific, Australia) ซึ่งน้ำหนักแป้งข้าวเจ้าและเส้นใยอาหาร ตามตาราง 3.1 โดยให้ RVA ทำงานตามสภาวะที่กำหนดให้ ดังแสดงในตาราง 3.2 จากกราฟการเปลี่ยนแปลงความหนืดต่อเวลา (Pasting curve) อ่านและบันทึกค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ ความหนืดสูงสุด (Peak viscosity; PV) ความหนืดต่ำสุด (Trough) ความแตกต่างของความหนืดสูงสุดและความหนืดต่ำสุด (Breakdown; BD) ความหนืดสุดท้าย (Final viscosity; FV) ผลต่างของความหนืดสุดท้ายกับความหนืดต่ำสุด (Setback) เวลาในการเกิดความหนืดสูงสุด (Peak time) และอุณหภูมิแป้งเปียก (Pasting temperature; PT)

ตาราง 3.1 น้ำหนักที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างแป้งผสมกับเส้นใยอาหารสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะร้อน

ความเข้มข้นของเส้นใยอาหาร (ร้อยละ)	แป้ง (กรัม)	ปริมาณของเส้นใยอาหาร (กรัม)	น้ำ (กรัม)
0.00	2.80	0	25.2
2.50	3.03	7	21
5.00	2.96	14	14
7.50	2.87	21	7

ตาราง 3.2 สภาวะของ RVA ที่ใช้ในการศึกษาพฤติกรรมของการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะร้อนของแป้ง เมื่อ Idel Temperature เป็น 50 ± 1 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง:นาที:วินาที)	ประเภท	ค่าที่ใช้
00:00:00	ความเร็ว	960 rpm
00:01:00	ความเร็ว	160 rpm
00:01:00	อุณหภูมิ	50°C
00:04:45	อุณหภูมิ	95°C
00:07:15	อุณหภูมิ	95°C
00:11:00	อุณหภูมิ	50°C

หมายเหตุ : Idel temperature หมายถึงอุณหภูมิที่ตั้งไว้คอยอุณหภูมิของภาชนะซึ่งมีตัวอย่างและบรรจุอยู่ภายในเมื่ออุณหภูมิของภาชนะบรรจุสูงขึ้นถึงอุณหภูมินี้ RVA จะเริ่มบันทึกข้อมูลต่างๆ

3.4.3.2 คุณสมบัติด้านรีโอโลยี (Rheology properties)

ศึกษาคุณสมบัติด้านรีโอโลยีของแป้งข้าวเจ้าเมื่อมีการเติมเส้นใยอาหารจากมะม่วงและฝรั่งโดยใช้เครื่อง Rheometer (AR 2000 ex, TA Instruments) ใช้หัววัด TA แบบ Plate SSL ST Cross Hatched 40 mm และทำการทดสอบแบบสั่น (Oscillatory testing) เตรียมเจลของแป้งข้าวเจ้าที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และเติมเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตแตกต่างกัน 4 วิธีเมื่อความเข้มข้นของเส้นใยอาหารเป็นร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 7.5 โดยนึ่งน้ำแป้งที่มีการเติมเส้นใยอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆ เหล่านั้นด้วยไอน้ำเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เจลเย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำเจลแป้งข้าวเจ้าที่ได้ไปคุณสมบัติทางรีโอโลยี โดยการนึ่งน้ำแป้งที่มีการเติมเส้นใยอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยไอน้ำเป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เจลเย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำเจลแป้งข้าวเจ้าที่ได้ไปคุณสมบัติทางรีโอโลยี

โดยเริ่มที่การศึกษาเบื้องต้นเพื่อหา Linear viscoelastic region (LVR) นั่นคือความเครียด (Strain) หรือความเค้น (Stress) ที่ไม่ทำให้โครงสร้างของเจลแบ่งข้าวถูกทำลาย ซึ่งทำโดยการทดสอบแบบ Amplitude sweep test เมื่อกำหนดให้อุณหภูมิ และความถี่ในการวิเคราะห์คงที่ ที่ 25 องศาเซลเซียส และ 1 Hz ตามลำดับ และแปรค่าความเครียด (Strain) ตั้งแต่ร้อยละ 0.01-1000 ผลจากการทดลองดังกล่าวได้เลือกความเครียดร้อยละ 2 เพื่อนำไปใช้ในศึกษา Frequency sweep test และ Amplitude sweep test ของเจลแบ่งข้าวเจ้าต่อไป การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งต่อคุณสมบัติทางรีโอโลยีของเจลแบ่งข้าวเจ้าโดย Frequency sweep test ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเครียดร้อยละ 2 และแปรความถี่ตั้งแต่ 1 ถึง 10 Hz บันทึกค่าโมดูลัสสะสม (Storage modulus; G') และ โมดูลัสที่สูญเสีย (Loss modulus; G'') ส่วนการศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งต่อคุณสมบัติทางรีโอโลยีของเจลแบ่งข้าวเจ้าโดย Amplitude sweep test ที่อุณหภูมิ และความถี่คงที่ที่ 25 องศาเซลเซียส และ 1 Hz ตามลำดับ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง ความเครียดตั้งแต่ร้อยละ 0.01-1000 บันทึกค่า Storage modulus (G') Loss modulus (G'') Loss tangent ($\tan \delta$) และ Complex modulus (G^*) ที่ความเครียดร้อยละ 2 การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม Rheology Advantage Data Analysis Software Version V5.4.8 (TA Instruments)

3.4.3.3 คุณสมบัติด้านความร้อน (Thermal properties) (Debet *et al.*, 2006)

ศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน 4 วิธี และความเข้มข้นของเส้นใยอาหารนั้นเมื่อเติมลงในแป้งข้าวเจ้า 4 ความเข้มข้นคือร้อยละ 0, 2.5, 5.0, และ 7.5 ต่อคุณสมบัติด้านความร้อนของแป้งข้าวเจ้าซึ่งตัวอย่างประมาณ 15 มิลลิกรัม (บันทึกน้ำหนักละเอียดถึงทศนิยมสี่ตำแหน่ง) ใส่ในภาชนะบรรจุอะลูมิเนียม (DSC Tzero Pan, TA 901683901) และปิดภาชนะบรรจุด้วยฝา (Lid Tzero Hermetic, TA 901684901) นำภาชนะบรรจุอะลูมิเนียมใส่ในช่องตัวอย่างของเครื่อง Differential scanning calorimeter (Q200, TA Instruments, USA) และให้ความร้อนตัวอย่างโดยเริ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 160 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการให้ความร้อนเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที คำนวณคุณสมบัติการเกิดเจลในเซชันของแป้งข้าวเจ้า ได้แก่ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดเจลในเซชัน (The onset temperature; T_{onset}) อุณหภูมิสูงสุดของการเกิดเจลในเซชัน (The peak temperature; T_{peak}) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลในเซชัน (The conclusion temperature; $T_{conclusion}$) และค่าพลังงานความร้อนที่ใช้ในการเกิดเจลในเซชัน (The enthalpy; ΔH) โดยใช้โปรแกรม TA Instruments Universal Analysis 2000 Software Version 4.4A (TA Instruments Waters LLC, USA)

3.4.3 การศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วง และฝรั่ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้า

ศึกษาการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้าโดยดัดแปลงจากวิธีของ Kaur and Sandhu, 2010 และ Megazyme (K-TSTA 07/11) เริ่มต้นโดยนำแป้งข้าวเจ้าดิบที่บดเป็นผงมาร้อนผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช แล้วชั่งตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกัวยร์กัมที่มีความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรจำนวน 5 มิลลิลิตร และเอนไซม์อะมิเลสที่ทนความร้อน

(Thermostable α -amylase) ที่เจือจางในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 30 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดสจำนวน 0.1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน บ่มหลอดทดลองนี้ในเครื่องเขย่า Model LSI-1005R (Lab Tech, Koral) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 170 rpm เป็นเวลา 20 และ 120 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดหาปริมาณกลูโคสที่ย่อยได้ในเวลา 20 นาที (G 20) และปริมาณกลูโคสที่ย่อยได้ในเวลา 120 นาที (G 120) ปริมาณกลูโคสทั้งหมด (Total glucose; TG) ตรวจวัดได้จากการเจลาติไนซ์แป้งข้าวเจ้าในน้ำเดือด และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดสจนเสร็จสิ้นการย่อย แล้วนำไปตรวจวัดหาปริมาณกลูโคสทั้งหมด (TG) ทั้งนี้ตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้วิธีของ Megazyme โดยปิเปตสารละลายใสหลังการปั่นเหวี่ยงแป้งที่ถูกย่อย ณ สภาวะต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตรและใส่ในหลอดทดลอง เติม GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร ทำแบลงค์ โดยนำโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 4.5) ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มา 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร และทำกลูโคสมาตรฐาน โดยปิเปต D-glucose 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ GOPOD Reagent 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่าง แบลงค์ และกลูโคสมาตรฐาน มาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณของกลูโคส เพื่อนำไปคำนวณเป็นแป้ง 3 ประเภทที่แบ่งตามความสามารถในการถูกย่อยตามคำอธิบายของ Englyst et al (1992) อ้างอิงโดย Sharavathy et al. (2001) ได้ดังนี้

1) แป้งที่ย่อยได้อย่างรวดเร็ว (Rapidly digestible starch, RDS) แป้งประเภทนี้คือแป้งที่สามารถถูกย่อยได้หมดภายในเวลา 20 นาที

$$RDS = G_{20} \times 0.9$$

2) แป้งที่ทนทานต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ (Resistant starch, RS) คือแป้งที่ไม่สามารถย่อยสลายได้หมดภายในเวลา 120 นาที

$$RS = TS - (RDS + SDS) \text{ หรือ } (TG - G_{120}) \times 0.9$$

3) แป้งที่ย่อยได้ช้า (Slow digestible starch, SDS) คือแป้งที่ย่อยได้หมดในช่วงเวลา 20-120 นาที และ คำนวณค่าดัชนีในการถูกย่อยได้ของแป้ง (Starch digestibility index, SDI) โดยใช้สมการดังต่อไปนี้

$$SDS = (G_{120} - G_{20}) \times 0.9$$

$$SDI = (RDS/TS) \times 100$$

$$\text{เมื่อ } TS = TG \times 0.9$$

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่ง ประเมินผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง และฝรั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดขณะร้อน คุณสมบัติด้านรีโอโรยี คุณสมบัติด้านความร้อน ศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วง และฝรั่งต่อการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้าโดยเก็บรวบรวมข้อมูลเชิงปริมาณ

จากเครื่องมือวิเคราะห์ ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ และนำเสนอข้อมูลในรูปแบบค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.6.2 สถิติทดสอบสมมติฐานสำหรับการทดลองขั้นตอนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่ได้จากกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างกันคือ F-วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS Version 15.0

สถิติทดสอบสมมติฐานสำหรับการทดลองขั้นตอนที่ 2 การศึกษาผลของเส้นใยอาหารจากมะม่วง หรือฝรั่งที่ผลิตจากกรรมวิธีการผลิตที่ต่างกันต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเจ้าคือ F-test วิเคราะห์ความแปรปรวนสองทางเดียว (Two-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS Version 15.0

สถิติทดสอบสมมติฐานสำหรับการทดลองขั้นตอนที่ 3 การศึกษาผลของเส้นใยอาหารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วง และฝรั่งที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการย่อยได้ของแป้งข้าวเจ้าคือ F-test วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ตามวิธีของ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS Version 15.0