# บทที่ 2
# วิธีการศึกษาวิจัย

ทำการศึกษาวิจัยเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆคือ ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาการสกัดไซรัปจากกล้วยตากตกเกรดด้วยเอนไซม์สองชนิดแบบอนุกรม โดยให้ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ลดลงเป็นลำดับ เพื่อให้ได้วิธีการและปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการสกัด นำไซรัปที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้ และคุณสมบัติบางประการในไซรัป จากนั้นจะทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ และคุณค่าทางโภชนาการที่แนะนำในการบริโภคแต่ละวัน และในขั้นตอนที่ 2 จะศึกษาผลของไซรัปต่อระบบประสาทส่วนกลางของหนูถีบจักร ทั้งในด้านพฤติกรรมการกิน น้ำหนักโดยรวม และระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์เบื้องต้นต่อระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ การเคลื่อนไหว (Locomotor Activity Test) การนอนหลับเนื่องจากบาร์บิทูเรต (Barbiturate Potentiation Test) การเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี Morris's water maze

## ตอนที่ 1 การผลิตไซรัปกล้วยด้วยเอนไซม์สองชนิด

### 1 การศึกษาการสกัดไซรัปกล้วยแบบอนุกรมด้วยเอนไซม์สองชนิด

วัตถุดิบที่ใช้คือกล้วยตากที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือกล้วยตากตกเกรดจากวิสาหกิจชุมชนกลุ่มกล้วยตากบุปผา ทำ การสกัดน้ำหวานจากกล้วยตากดังกล่าว โดยการสกัดจะใช้เอนไซม์สองชนิด ได้แก่ เ อนไซม์เพคติเนส (Pectinex® Ultra SP-L) มีกิจกรรม 26,000 PG/ml (Polygalacturonase/ml) ที่ระดับความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาไว้แล้วคือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ของน้ำหนักวัตถุดิบ (ปริมาตรต่อน้ำหนักกล้วยตาก) ใช้เวลา 180 นาทีบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast ®1.5 L) มีกิจกรรม 840 EGU/ml (Endo-Glucose Unit/ml) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ใช้เวลา 180 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยสภาวะในการสกัดน้ำเชื่อมกล้วยดังกล่าวอ้างอิงจากรายงานวิจัยของอรรณพ และ วาสนา (2551) ที่ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส และอะมัยเลส ในการผลิตไซรัปจากกล้วยตากตกเกรด ที่ใช้เอนไซม์สามชนิดในการศึกษา โดยเอนไซม์ที่ให้ปริมาณไซรัปสูงสุด คือ การใช้เอนไซม์เพคติเนส และเอนไซม์เซลลูเลส โดยเอนไซม์อันดับที่สาม ไม่ว่าจะใช้เอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส หรืออะมัยเลสก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การสกัดแบบอนุกรมดังกล่าวจะให้ปริมาณของน้ำกล้วยในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าลำดับในการใช้เอนไซม์เพื่อการสกัดในแต่ละอนุกรมนั้น ไม่เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความแตกต่างในส่วนของปริมาณผลผลิตน้ำกล้วยโดยรวมที่ได้ (อรรณพ และ วาสนา, 2551) จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงมีแนวคิดที่ว่า ถ้าทำการสกัดน้ำเชื่อมกล้วยโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้ดีที่สุดคือ

เอนไซม์เพคติเนสเป็นเอนไซม์หลัก ร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส มาทำการสกัดแบบอนุกรมเช่นเดิม โดยลักษณะการสกัดจะปรับปริมาณเอนไซม์ลดลงตามลำดับดังตารางที่ 2 แสดงลำดับการสกัด ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่ม

ตารางที่ 2 แสดงกระบวนการสกัดไซรัปกล้วยตากแบบอนุกรมด้วยเอนไซม์สองชนิด

| ลำดับการสกัดของเอนไซม์ | ร้อยละความเข้มข้นของเอนไซม์ (ปริมตร/น้ำหนัก) | เวลาในการสกัด ต้มเดือด-บ่ม-บ่ม (นาที) | อุณหภูมิที่ใช้ (องศาเซลเซียส) |
|---|---|---|---|
| เพคติเนส-เพคติเนส | 0.15-0.10 | 30-180-180 | 100-50-60 |
| เพคติเนส-เพคติเนส | 0.15-0.05 | 30-180-180 | 100-50-60 |
| เพคติเนส-เซลลูเลส | 0.15-0.10 | 30-180-180 | 100-50-60 |
| เพคติเนส-เซลลูเลส | 0.15-0.05 | 30-180-180 | 100-50-60 |
| เซลลูเลส-เพคติเนส | 0.10-0.15 | 30-180-180 | 100-60-50 |
| เซลลูเลส-เพคติเนส | 0.10-0.05 | 30-180-180 | 100-60-50 |

จากนั้นนำน้ำกล้วยที่ได้ไปทำการระเหยน้ำแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50°C ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน vacuum evaporator เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสกล้วยมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด (ชิดชัย และคณะ, 2547) จากนั้นนำไซรัปกล้วยที่ได้ในแต่ละการทดลองนำมาทำการตรวจสอบดังนี้

- ร้อยละของผลผลิต (% Yield)
- ค่าเด็กโตรสอิควิวาเลนซ์ (DE value)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) ด้วยเครื่อง Hand refractometer
- ค่าสีด้วยเครื่อง Hunter Lab
- ประเมินราคาต้นทุนการผลิต

**2. การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของไซรัปกล้วย** (สุรีพันธุ์,_____) ได้แก่

- ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโคส ด้วยเครื่อง HPLC
- ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วยเครื่อง Hand Refractometer
- ค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter
- ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC., 2000)
- ปริมาณความชื้น (AOAC., 2000)
- ปริมาณเถ้า (AOAC., 2000)

- ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ด้วยเครื่องวัดค่า Water Activity

**3. การตรวจสอบคุณสมบัติของไซรัปกล้วยด้านโภชนาการ** โดยบริษัท เอแอลเอส แลบอราทอรี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด ได้แก่ ปริมาณน้ำ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่สำคัญ ชนิดและปริมาณวิตะมินที่สำคัญ แร่ธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ปริมาณโปรตีน ปริมาณโคเลสเตอรอล ปริมาณไขมัน ชนิดและปริมาณกรด ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) โดยคำนวนจาก (คาร์โบไฮเดรต = 100 - (น้ำ + โปรตีน + ไขมัน + เถ้า)) พลังงานทั้งหมด ได้จากสารอาหาร 3 ชนิดคือ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดย โปรตีน 1 กรัม ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี ไขมัน 1 กรัม ให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี และปริมาณเถ้า

**4. การตรวจสอบไซรัปกล้วยทางจุลชีววิทยา** ได้แก่

- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Downes and Ito, 2001)
- จำนวนยีสต์และรา (Downes and Ito, 2001)

**ตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของไซรัปกล้วยในหนูทดลอง**

**2. การศึกษาพฤติกรรมของหนูทดลอง**

**2.1 กลุ่มตัวอย่าง (ระบุชนิด สายพันธุ์ เพศ อายุ หรือน้ำหนัก จำนวนสัตว์และวิธีคำนวณ)**

หนูถีบจักรเพศผู้ (พันธุ์ ICR mice) น้ำหนัก 20-25 กรัม ซึ่งสั่งจากศูนย์สัตว์ทดลองศาลายา ม.มหิดล หนูทดลองทุกตัวจะถูกเลี้ยงกรงละ 3-4 ตัว ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2$^{0}$C ควบคุมแสง Light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ในแต่ละวัน หนูทดลองทุกตัวจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง และทำการเปลี่ยนวัสดุรองนอนสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

สัตว์ทดลองจำนวน 50 ตัวจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัวโดยสุ่ม เป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา

| กลุ่มสัตว์ทดลอง | จำนวนสัตว์ทดลอง (ตัว) |
|---|---|
| 1. กลุ่มควบคุม (0.9% NSS) | 10 |
| 2. กลุ่มทดลองให้ไซรัปกล้วยความเข้มข้น 1% | 10 |
| 3. กลุ่มทดลองให้ไซรัปกล้วยความเข้มข้น 10% | 10 |
| 4. กลุ่มทดลองให้ไซรัปกล้วยความเข้มข้น 20% | 10 |
| 5. กลุ่มทดลองให้น้ำผึ้งความเข้มข้น 10% | 10 |

**เกณฑ์การคัดเลือกหรือคัดแยกสัตว์ทดลอง (Inclusion and Exclusion criteria)**

เกณฑ์การคัดเลือกต้องเป็นหนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-25 กรัม มีสุขภาพสมบูรณ์ และจะใช้เฉพาะสัตว์ทดลองที่ให้สารทดสอบครบตามเวลาที่กำหนด คัดแยกสัตว์ที่มีอาการผิดปกติ และสัตว์ที่เสียชีวิตออกจากการทดลอง

**เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria)**

จะเลิกการศึกษาเมื่อพบว่าการทดลองนี้จะทำให้เกิดโรคติดต่อร้ายแรงหรือเป็นภัยอันตรายต่อสัตว์ทดลอง มนุษย์และสิ่งแวดล้อม เช่นสัตว์แสดงอาการติดเชื้อ ไม่รับประทานอาหารหรือน้ำดื่ม มีการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติไปจากปกติ เช่นการชัก เป็นแผลเรื้อรัง เป็นต้น

**2.2 วิธีดำเนินการวิจัย**

**2.2.1 การให้สารทดสอบ**

หนูถีบจักรเพศผู้ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัวโดยสุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมจะให้น้ำเกลือ (0.9% NSS) และ กลุ่มที่ 2-4 ให้ไซรัปกล้วยทางปาก (gavage) 3 ขนาด (1, 10, 20%) และกลุ่มที่ 5 ให้น้ำผึ้งความเข้มข้น 10% วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน

**2.2.2 การทดสอบฤทธิ์สารทดสอบต่อพฤติกรรมการกิน น้ำหนักโดยรวม และระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง**

จะทำการวัดปริมาณอาหารทุกวัน ชั่งน้ำหนักสัตว์ทดลองทุกสัปดาห์ และวัดระดับน้ำตาลในเลือด (blood sugar) โดยจะทำการงดอาหาร 12 ชม. และเจาะเลือดจากหางหนูประมาณ 20 ไมโครลิตร (Yeung และคณะ 2008) เพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสโดยเครื่องตรวจระดับน้ำตาลกลูโคส (glucometer) (Mediscience

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 7 ธ.ค. 2555
เลขทะเบียน 190948
เลขเรียกหนังสือ

Optium, Abbott Laboratories MediScience Products Bedford, MA, USA) โดยทำการเจาะเลือดก่อนให้สารทดสอบ 1 ครั้งเพื่อเป็นข้มูลพื้นฐาน และเจาะเลือดอีกครั้งหลังให้สารทดสอบ 1, 2 และ 3 เดือน

**2.2.3 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารทดสอบ**

2.2.3.1 **การทดสอบการเคลื่อนไหว (Locomotor Activity Test)** เป็นการประเมินฤทธิ์เบื้องต้นต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยใช้วิธีการวัดพฤติกรรมเคลื่อนไหว (locomotor activity) การทดลองใช้เครื่อง UGO Basile Activity Cage ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถจะบันทึกการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลอง แล้วเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้า ส่งไปยังเครื่องบันทึกผล โดยเริ่มจากการปล่อยให้สัตว์ทดลองอยู่ในเครื่องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานควบคุม (baseline control) จากนั้นให้สารทดสอบทางปาก แล้วนำหนูกลับเข้าเครื่องอีกครั้ง บันทึกข้อมูลทุก 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที โดยเครื่องจะบันทึกจำนวนครั้งของการเคลื่อนไหว (number of movement) และความเร็วในการเคลื่อนไหว (speed of movement) การทดลองนี้จะทำหลังการให้สารทดสอบ 3 เดือน

2.2.3.2 **การทดสอบการนอนหลับเนื่องจากบาร์บิทูเรต (Barbiturate Potentiation Test)** เป็นการประเมินฤทธิ์เบื้องต้นต่อระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อให้สารทดสอบร่วมกับยาที่มีฤทธิ์กดสมอง โดยเริ่มจากให้สารทดสอบต่างๆ เข้าทางปาก แล้วตามด้วยการฉีดยาสลบ pentobarbital sodium ขนาด 45 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง แล้วเปรียบเทียบระยะเวลาการหลับของสัตว์ทดลองในกลุ่มต่าง ๆ (ระยะเวลาการหลับของสัตว์ทดลองจะเริ่มตั้งแต่การที่หนูเสีย righting reflex จนถึงระยะเวลาที่ righting reflex กลับคืนมา) (Tsuji et al., 1996) จะทำในวันสุดท้ายของการให้สารทดสอบ 3 เดือน

**2.2.3.3 การทดสอบการเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี Morris's water maze** เป็นการทดสอบพฤติกรรมใน MWM เริ่มต้นขึ้นในปี 1984 โดย Morris เป็นการวัด spatial memory (D' Hooge and De Deyn, 2001) การทดลองนี้ใช้อุปกรณ์ที่ประกอบด้วยอ่างสีดำ ในอ่างบรรจุน้ำมีความลึก 13 เซนติเมตร กว้าง 70 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 25±1 องศาเซลเซียส ภายในอ่างมีแท่น (hidden platform) เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร แบ่งอ่างออกเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน วาง hidden platform ที่กึ่งกลางของส่วนใดส่วนหนึ่ง (อยู่คงที่ตลอดการทดลอง) การทดสอบจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ training trials และ testing trials วิธีการทดสอบ training trials วันแรกของการทดสอบ ปล่อยหนูลงที่จุดกึ่งกลางของขอบอ่างน้ำที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วน จับเวลาที่หนูใช้ในการว่ายน้ำ จนขึ้นไปยืนบน hidden platform บันทึกเวลา โดยปล่อยให้หนูยืนค้างบน hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงนำมาพัก 3 นาที โดยให้หนูใช้เวลาในการว่ายน้ำหา hidden platform มากที่สุด 60 วินาที (Watanabe et al., 2003) ถ้า

ครบ 60 วินาที แล้วหนูยังไม่สามารถขึ้นไปยืนบน hidden platform ให้จับหนูไปยืนบน hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที ทำการทดลองซ้ำในส่วนอื่น ๆ ต่อไปจนครบทั้ง 3 ส่วน (Xu et al., 2000) การทดลองนี้จะทำหลังการให้สารทดสอบ 1 และ 3 เดือน

**2.3 การกำจัดซากสัตว์หรือการจัดการกับสัตว์หลังสิ้นสุดการวิจัย**

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายอย่างสงบด้วยการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และซากสัตว์ทดลองจะถูกทำลายโดยวิธีการฝังใต้พื้นดินลึกไม่ต่ำกว่า 50 เซนติเมตร