

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเปรียบเทียบวิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวอะมิโลสสูงและการศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 ดำเนินการวิจัยตามลำดับดังต่อไปนี้

1. แผนการวิจัย
2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
3. วิธีดำเนินการวิจัย
4. สถิติที่ใช้ในการวิจัย
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.1 แผนการวิจัย

ในการวิจัยการเปรียบเทียบวิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวอะมิโลสสูงและการศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 ผู้วิจัยจัดแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ซึ่งมี 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A คือ สารละลาย 10 ชนิด ได้แก่

1. น้ำ
2. เอทานอลความเข้มข้น 95%
3. กรดแลคติกความเข้มข้น 10 mmol / L
4. กรดแลคติกความเข้มข้น 10 mmol / L ในเอทานอล
5. กรดแลคติกความเข้มข้น 20 mmol / L
6. กรดแลคติกความเข้มข้น 20 mmol / L ในเอทานอล
7. กรดซิตริกความเข้มข้น 10 mmol / L
8. กรดซิตริกความเข้มข้น 10 mmol / L ในเอทานอล
9. กรดซิตริกความเข้มข้น 20 mmol / L
10. กรดซิตริกความเข้มข้น 20 mmol / L ในเอทานอล

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาในการบ่ม 4 ระดับ ได้แก่ 0 , 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง แต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 2 ซ้ำขึ้นไป

3.1.1 เปรียบเทียบวิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวอะมิโลสสูง

3.1.1.1 การเตรียมแป้งข้าวเจ้าเหลือง 11

1) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน แล็ก ความชื้น ปริมาณอะมิโลส ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณเส้นใยและปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant starch)

3.1.2 วิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวเจ้าเหลือง 11

3.1.2.1 องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ไขมัน เกล็ด ความชื้น คาร์โบไฮเดรต ทั้งหมด เส้นใย ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch) ปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant starch) และปริมาณแป้งที่ย่อยได้ (Digestible starch)

3.1.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางด้านความร้อน (thermal properties) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) และศึกษาระดับการเกิดเจลลิตีโนเซชัน

3.1.3 การศึกษาความคงตัวของแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3

3.1.3.1 ศึกษาปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย

3.2 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1. วัสดุดิบ

3.2.1.1 ข้าวเจ้าเหลือง 11 ที่ปลูกในจังหวัดมหาสารคาม ปีการเพาะปลูก 2554

3.2.2. อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

3.2.2.1 เครื่องแก้วต่าง ๆ (Pyrex, Germany)

3.2.2.2 เครื่องชั่งละเอียด (Presica 25A, Switzerland)

3.2.2.3 ตะแกรงละเอียดขนาด 100 เมช (Standard sieve, USA)

3.2.2.4 Magnetic stirrer bar (Kitchenaid, USA)

3.2.2.5 เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

3.2.2.6 Micro-pipette (VIPR) ขนาด 1000 μ l

3.2.2.7 เครื่องให้ความร้อน (Water bath) (Mettler schutzart, Germany)

3.2.2.8 เครื่อง UV-spectrophotometer (Shimadzu, Japan)

3.2.2.9 เครื่อง Magnetic stirrer (Kitchenaid, USA)

3.2.2.10 เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) (Hamony, Japan)

3.2.2.11 เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge) (Universal 320R, Germany)

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

3.2.2.13 เครื่องบดละเอียด (Hammer Mill)

3.2.2.14 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt)

3.2.2.15 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (BUCHI E-816, Switzerland)

3.2.2.16 เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (TA Q200, USA)

3.2.2.17 เตาเผาเถ้า (Muffle furnace, Model S1202PID, Thailand)

3.2.3 สารเคมี

3.2.3.1 กรดซิติริก

3.2.3.2 กรดแลคติก

3.2.3.3 เอทานอล

3.2.3.4 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid), (Fluka; Germany)

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

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

- 3.2.3.7 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate), (Analar, England)
- 3.2.3.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide), (Univar, Australia)
- 3.2.3.9 ปีโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether), (Rci labscan, thailand)
- 3.2.3.10 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulphate), (Univar, Australia)
- 3.2.3.11 เอนไซม์ Amyloglucosidase
- 3.2.3.12 เอนไซม์ glucose oxidase-peroxidase (GOPOD)
- 3.2.3.13 เอนไซม์ amyloglucosidase
- 3.2.3.14 เอนไซม์ protease
- 3.2.3.15 เอนไซม์ α -amylase
- 3.2.3.16 สารละลายไอโอดีน
- 3.2.3.17 กรดอะซิติก
- 3.2.3.18 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride.2H₂O), (Fluka; Germany)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมแป้งข้าวเจ้าเหลือง 11

นำข้าวเจ้าพันธุ์เหลือง 11 มาแยกสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำมาโม่ด้วยเครื่องบดละเอียด (hammer mill) นำแป้ง (flour) ที่ได้จากการโม่มาผ่านตะแกรงลวดขนาด 100 เมช เพื่อให้แป้งมีความละเอียดมากขึ้น เก็บแป้งที่ร่อนได้ในภาชนะที่แห้ง ปิดสนิทและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

3.3.1.1 ปริมาณความชื้น (Moisture content) (AOAC, 2000) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.1.2 ปริมาณโปรตีน (crude protein) ด้วยวิธีเจลดาลท (Kjeldahl method) (AOAC, 2000) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.1.3 ปริมาณไขมันด้วยวิธีชอกทเลท (Extractable lipid : Soxhlet method) (AOAC, 2000) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.1.4 ปริมาณเถ้าด้วยวิธี Dry ashing (AOAC, 2000) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.1.5 ปริมาณอะมิโลส (Juliano, 1971) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดย $100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{ความชื้น} + \% \text{เถ้า} + \% \text{ไฟเบอร์})$

3.3.1.7 ปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant starch) (Megazyme International Ireland, 2009) (ดั่งภาคผนวก)

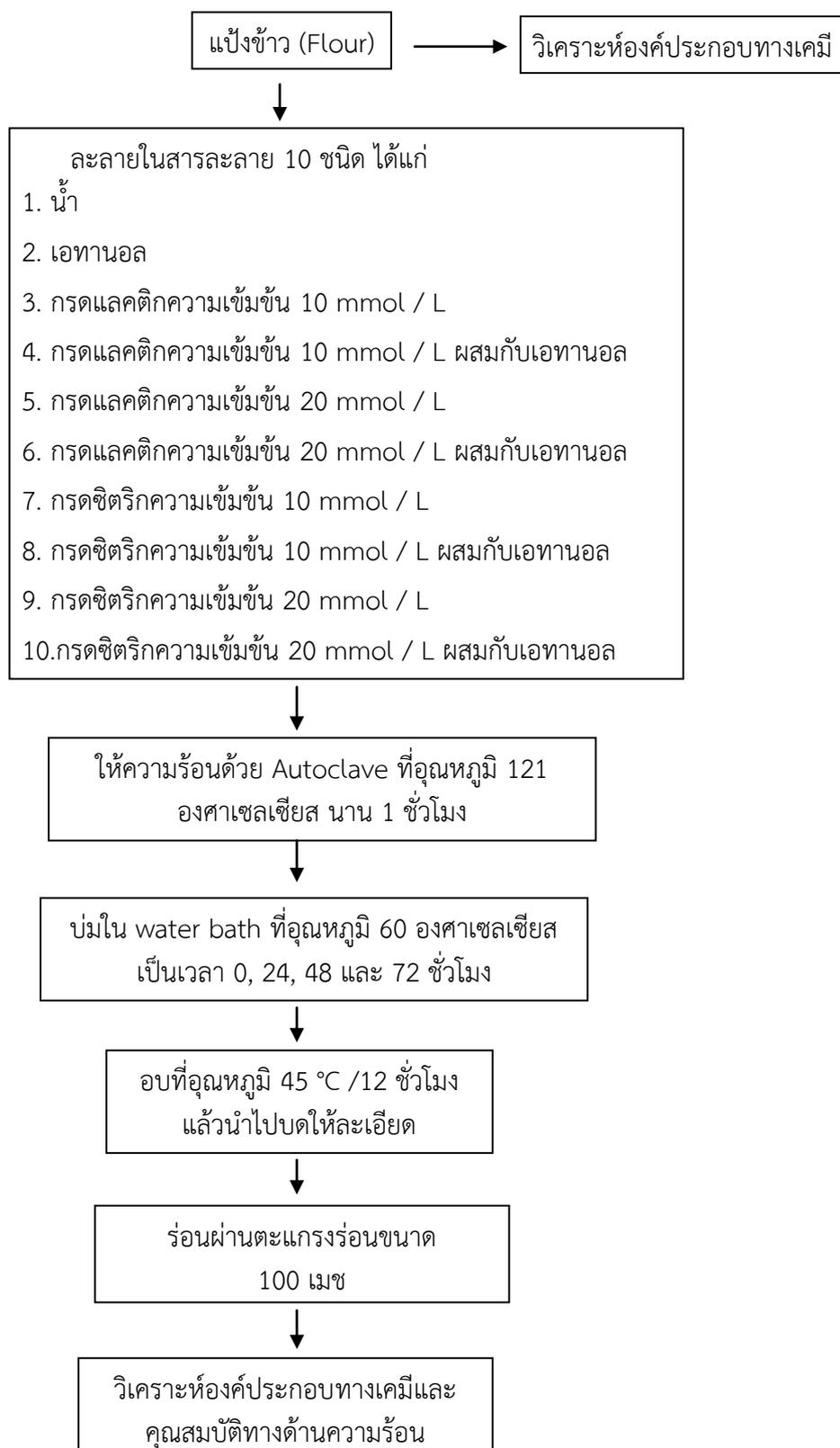
3.3.1.8 ปริมาณเส้นใยดิบ (AOAC, 2000) (ดั่งภาคผนวก)

3.3.2 วิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวเจ้าเหลือง งานวิจัยนี้จะทำการเปรียบเทียบวิธีการผลิต RS ชนิดที่ 3 ในแป้งข้าวโดยดัดแปลงวิธีของ Onyango และคณะ, (2006) โดยใช้สารละลาย 10 ชนิดดังต่อไปนี้

1. น้ำ
2. เอทานอล

3. กรดแลคติกความเข้มข้น 10 mmol / L
4. กรดแลคติกความเข้มข้น 10 mmol / L ในเอทานอล
5. กรดแลคติกความเข้มข้น 20 mmol / L
6. กรดแลคติกความเข้มข้น 20 mmol / L ในเอทานอล
7. กรดซิตริกความเข้มข้น 10 mmol / L
8. กรดซิตริกความเข้มข้น 10 mmol / L ในเอทานอล
9. กรดซิตริกความเข้มข้น 20 mmol / L
10. กรดซิตริกความเข้มข้น 20 mmol / L ในเอทานอล

มีวิธีการผลิตดังนี้ ชั่งแป้งข้าว 20±5 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) จากนั้นเติมสารละลายที่แตกต่างกัน 10 ชนิด ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงไป คนแป้งให้เข้ากับสารละลายด้วยแท่งแก้ว ปิดฝาขวดแก้วแล้วนำไปเหนี่ยวนำโดยใช้เครื่องหม้อนึ่งแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแป้งทนต่อการย่อยจากนั้นนำแป้งที่ผ่านการเหนี่ยวนำไปบ่มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำแป้งที่ผ่านการบ่มไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วทำการโม่ โดยใช้เครื่องบดละเอียดให้เป็นแป้งที่มีเนื้อละเอียดสีขาว นำแป้งมาผ่านตะแกรงขนาด 100 เมช ก่อนนำมาเก็บไว้ในภาชนะที่แห้ง ปิดสนิทและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามรายละเอียดในข้อ 3.3.2.1 และวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านความร้อนตามรายละเอียดในข้อ 3.3.2.2



ภาพประกอบ 3.1 วิธีการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยชนิดที่ 3 จากแป้งข้าวเจ้าเหลือง 11

3.3.2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

- 1) ปริมาณความชื้น (Moisture content) (AOAC, 2000) (ตั้งภาคผนวก)
- 2) ปริมาณโปรตีน (crude protein) ด้วยวิธีเจลดาลท (Kjeldahl method) (AOAC, 2000) (ตั้งภาคผนวก)
- 3) ปริมาณไขมันด้วยวิธีซอกหลท (Extractable lipid : Soxhlet method) (AOAC, 2000) (ตั้งภาคผนวก)
- 4) ปริมาณเถ้าด้วยวิธี Dry ashing (AOAC, 2000) (ตั้งภาคผนวก)
- 5) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดย $100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{ความชื้น} + \% \text{เถ้า} + \% \text{ไฟเบอร์})$ การทดสอบองค์ประกอบทางเคมีข้างต้นจะทำการคัดเลือกสารละลายและระยะเวลาในการบ่มที่ทำให้ได้ปริมาณแป้งทนต่อการย่อยมากที่สุด
- 6) ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch) (ตั้งภาคผนวก)
- 7) ปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant starch) (Megazyme International Ireland, 2009) (ตั้งภาคผนวก)

3.3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางด้านความร้อน (thermal properties) ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (ตั้งภาคผนวก) และศึกษาระดับการเกิดเจลลิ่งในเซชัน โดยคัดเลือกตัวอย่างแป้งทนต่อการย่อยที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยความร้อนโดยใช้สารละลายน้ำ เอทานอล กรดแลคติก 10 mmol และกรดแลคติก 10 mmol ในเอทานอล ระยะเวลาในการบ่ม 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.3.3 การศึกษาความคงตัวของแป้งทนต่อการย่อยต่อความร้อน (ดัดแปลงวิธีของ Lin และคณะ, 2011)

นำแป้งทนต่อการย่อยที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยความร้อนโดยใช้สารละลายน้ำ ระยะเวลาในการบ่ม 0 ชั่วโมงหรือไม่ได้บ่ม มา 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร มาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ คือ 100 , 120 , 140 , 160 องศาเซลเซียส ระยะเวลาให้ความร้อน 6 ระดับ เป็นเวลา 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 นาที แล้วทำให้เย็นด้วยน้ำแข็ง 5 นาที

3.3.3.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

- 1) ปริมาณแป้งที่ทนต่อการย่อย (Resistant starch) (Megazyme International Ireland, 2009) (ตั้งภาคผนวก)

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิจัยข้อมูล ประกอบด้วย

- 3.4.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- 3.4.2 สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานขององค์ประกอบทางเคมี คือ วิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ตามวิธีของ Scheffe ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยทดสอบสมมติฐานด้วยโปรแกรม SPSS

3.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

3.5.1 ได้แบ่งข้าวเจ้าเหลือง 11 ที่มีลักษณะเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารสุขภาพ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงหรือปรับใช้อย่างเหมาะสม

3.5.2 นำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแป้ง และใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

3.5.3 ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวที่ปลูกในประเทศได้