บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างเมล็ดทุเรียนที่ใช้ศึกษาเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตทุเรียนกวน ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์ชะนี (C) จากโรงงานขนาดย่อมในอำเภอตะพง จังหวัดระยอง และพันธุ์พื้นเมือง (N) จากอุตสาหกรรมครัวเรือนในอำเภอระแงะ จังหวัดนราธิวาส

3.1.2 สารเคมี

ก. สารเคมีในกลุ่มกรด

-กรดไฮดรคลอริค (Hydrochloric acid, HCl), กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), กรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3) และ กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

ข. สารเคมีในกลุ่มด่าง

-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

ค. สารเคมีในกลุ่มอินดิเคเตอร์

-เมทิลเรด (Methylred, $C_{15}H_{15}N_3O_2$), เมทิลีนบลู (Methylenblue, $C_{16}H_{18}N_3ClS$), โบรโมคลีซอลกรีน (Bromocresolgreen, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) (Merck, Germany) และ 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-Dinitrosalicylic acid, $C_7H_4N_2O_7$) (Sigma, Germany)

ง. สารเคมีในกลุ่มตัวทำละลาย

-ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether, C_5H_{12}) เอทานอล (Ethanol, C_2H_6O) เมทานอล (Methanol, CH_3OH) และคลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

จ. สารเคมีในกลุ่มอื่นๆ

-โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl), คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, $CuSO_4$), โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4), โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI), ไอโอดีน (Iodine, I_2), โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH),

ไดเบซิก โซเดียม ฟอสเฟส (Dibasic sodium phosphate, Na_2HPO_4), โมโนเบซิก โซเดียมฟอสเฟส (Monobasic sodium phosphate, NaH_2PO_4), โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, $NaKC_4H_4O_6$), ทริส ไฮดรอกซีเมทธิล อะมิโนมีเทน (Tris (hydroxymethyl) aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$), แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$) และ ไดเมทธิล ซัลโฟไซด์ (Dimethyl sulfoxide, C_2H_6OS) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

-อะไมโลสบริสุทธิ์จากมันฝรั่ง (Pure potato amylose)

-เอนไซม์ α-อะไมเลส (α-amylase)

-มอลโทส (Maltose)

-เอนไซม์ทริปซิน

-Benzoyl arginine-*p*-nitroanilide (BAPA, $C_{19}H_{22}N_6O_4$)

-Cotton seed oil

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

-เครื่องอบลมร้อนแบบถาด (บริษัทกล้วยน้ำไท, กรุงเทพมหานคร)

-เครื่องบดละเอียด (Model Cyclotec™ 1093, Foss, Sweden)

-เครื่องปั่น (Model Perfect blender, Moulinex, Mexico)

-เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model SevenEasy, Mettler Toledo, Switzerland)

-เครื่องโฮโมจิไนซ์ (Ystral x10/25, Germany)

-ตะแกรงร่อน ขนาด 150 ไมโครเมตร (Model AS200 digit, RETSCH®, Germany)

-ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Model UNB 500, Memert, Germany)

-เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Model HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge, Sanyo, Japan)

-เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

-เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Model TE 313S-DS 310, Sartorius, USA)

-เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง

ข. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

-เครื่องย่อยและเครื่องกลั่นโปรตีน (Model VA20, Gerhardt, Germany)

-เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (Model RF 16/6, Gerhardt, Germany)

-เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Model S-306 MK, Gerhardt, Germany)

-เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture analyzer) (Model TA-XT2i, Stable micro system, USA)

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Libra S22, Biochrom, England)

-เครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Viscosity Analyzer) (Model Super-4, Newport Scientific, Australia)

-Differential Scanning Calorimeter (Model Diamond DSC, PerkinElmer, Germany)

-เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Laser Particle Size Analyzer) (Model LS230, Coulter, USA)

-เครื่องวิเคราะห์ปริมาณผลึก X-ray Diffraction (X'Pert MPD, Phillips, Nertherland)

-กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (Model JSM-5800LV, JEOL, Japan)

-เครื่องรีโอมิเตอร์ (HAAKE RS1, Thermo Fisher Scientific Germany)

-กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Model CH30, Olympus, Japan)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างและปริมาณผลผลิต

ตัวอย่างเมล็ดทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ชะนีที่ใช้ในการวิจัย เตรียมให้อยู่ในรูปของฟลาวร์ ฟลาวร์ที่กำจัดเมือกและสตาร์ชเมล็ดทุเรียน ตามวิธีดังนี้

3.3.1.1 ฟลาวร์เมล็ดทุเรียน เตรียมโดยการล้างทำความสะอาดเมล็ดทุเรียน ผึ่งแดดให้แห้ง กำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล แล้วหั่นเมล็ดทุเรียนเป็นชิ้นบางๆ หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส บดและร่อนด้วยตะแกรง No. 100 เมช (ขนาด 150 ไมโครเมตร) และบันทึกผลผลิตที่ได้

3.3.1.2 ฟลาวร์เมล็ดทุเรียนที่กำจัดเมือก (Demucilaged flour) เตรียมฟลาวร์เมล็ดทุเรียนโดยดัดแปลงจากวิธีการของ สิรินาถ (2542) ด้วยการนำฟลาวร์เมล็ดทุเรียนจากข้อ 3.3.1.1 ปริมาณ 50 กรัม แช่ในสารละลายสารส้มอิ่มตัว ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง นำตะกอนแป้งผสมด้วยสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วยผ้าไนลอน แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำไปบดด้วยเครื่องบดแล้วร่อนด้วยตะแกรง No. 100 เมช (ขนาด 150 ไมโครเมตร) และบันทึกผลผลิตที่ได้

3.3.1.3 สตาร์ชเมล็ดทุเรียน เตรียมโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Tongdang (2008) สกัดโดยการใช้ฟลาวร์เมล็ดทุเรียนจากข้อ 3.3.1.1 ผสมกับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ อัตราส่วนของฟลาวร์เมล็ดทุเรียน 1 ส่วน ต่อสารละลาย เกลือโซเดียมคลอไรด์ 40 ส่วน คนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 15 นาที นำไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ คนอย่างต่อเนื่องอีก 15 นาที นำไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำเช่นนี้จนได้ส่วนที่ตกตะกอนเป็นสีขาว แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH ของสารละลายแป้งที่ได้ให้เป็นกลางด้วยสารละลายไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที นำสตาร์ชที่ได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และร่อนผ่านตะแกรง No. 100 เมช (ขนาด 150 ไมโครเมตร) และบันทึกผลผลิตที่ได้

3.3.1.4 เมือกของเมล็ดทุเรียน เตรียมโดยวิธีการของ Amin *et al.* (2007) ด้วยการนำเมล็ดสดหรือฟลาวร์เมล็ดทุเรียนที่ผ่านการสกัดไขมันออกด้วยวิธีของ A.O.A.C. (2000) นำฟลาวร์ที่สกัดไขมันออกผสมกับเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วแยกออกด้วยการกรอง นำส่วนตะกอนฟลาวร์ผสมด้วยกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่อยู่ด้านบนผสมกับเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ และนำไปแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนที่ได้มาผสมด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์และกรองแยกอีกครั้ง นำส่วนที่ได้มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และบันทึกผลผลิตที่ได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดชื่อย่อของตัวอย่างเมล็ดทุเรียนที่เตรียมให้อยู่ในลักษณะต่างๆ ดังตารางที่ 2

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 2 ชื่อเต็มและชื่อย่อของเมล็ดทุเรียนในรูปแบบต่างๆ

พันธุ์	รูปแบบตัวอย่าง	ชื่อย่อ
พื้นเมือง (N)	เมล็ดสด (Fresh seed)	NFS
	ฟลาวร์ (Flour)	NF
	ฟลาวร์ที่กำจัดเมือก (Demucilaged flour)	NDF
	สตาร์ช (Starch)	NS
ชะนี (C)	เมล็ดสด (Fresh seed)	CFS
	ฟลาวร์ (Flour)	CF
	ฟลาวร์ที่กำจัดเมือก (Demucilaged flour)	CDF
	สตาร์ช (Starch)	CS

3.3.2 ศึกษาสมบัติของเมล็ดทุเรียน

ศึกษาสมบัติของตัวอย่างเมล็ดทุเรียนที่อยู่ในรูปของฟลาวร์ ฟลาวร์ที่กำจัดเมือก และสตาร์ช

3.3.2.1 องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างฟลาวร์ ฟลาวร์ที่กำจัดเมือกและสตาร์ช ของเมล็ดทุเรียนทั้งสองพันธุ์ ดังต่อไปนี้

องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เยื่อใยและเถ้า โดยวิธีของ A.O.A.C. (2000)

3.3.2.2 สารต้านโภชนาการและสารพิษ

วิเคราะห์สารต้านโภชนาการและสารพิษของตัวอย่างดังระบุข้างต้นและในเมล็ดทุเรียนสดทั้งสองพันธุ์ ดังต่อไปนี้

-สารยับยั้งทริปซิน โดยวิธีของ Monder *et al.* (2009) และ Bhandari และ Kawabata (2006)

-สารยับยั้งอะไมเลส โดยวิธีของ Bernfeld (1955) และ Bhandari และ Kawabata (2006)

-Cyclopropene fatty acids ในเมล็ดทุเรียน โดยวิธีของ A.O.A.C. (2000)

3.3.2.3 สมบัติของสตาร์ชเมล็ดทุเรียน

วิเคราะห์สมบัติของสตาร์ชเช่นเดียวกับในข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 ดังกล่าวข้างต้น และได้ศึกษาสมบัติเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

3.3.2.3.1 สมบัติทางเคมี

-ปริมาณอะไมโลส โดยวิธีของ ISO (1987)

3.3.2.3.2 สมบัติเชิงโครงสร้าง

-รูปร่างและลักษณะของเม็ดสตาร์ชโดยการใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

-ลักษณะมอลตีครอส (Maltese Cross) ของเม็ดสตาร์ช ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงโพลาไรซ์ โดยวิธีของ กล้าณรงค์และเกื้อกูล (2550)

-ขนาดของเม็ดสตาร์ชด้วย Particle Size Analyzer โดยวิธีของ Kaur *et al.* (2004)

-รูปแบบโครงสร้างผลึกของเม็ดสตาร์ชด้วย X-ray diffractometer โดยวิธีของ Tulyathan *et al.* (2002)

-ความหนืดอินทรินสิค (Intrinsic viscosity) ด้วยคาปิลลารี่วิสโคมิเตอร์ โดยวิธีของ Islam *et al.* (2001)

3.3.2.3.3 สมบัติเชิงหน้าที่

-อุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนเซชั่นด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter โดยวิธีของ Torruco-Uco และ Betancur-Ancona (2007)

-เกิดรีโทรเกรเดชั่นด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter โดยวิธีของ Sandhu และ Singh (2007)

3.3.2.4 สมบัติเชิงหน้าที่

วิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของตัวอย่างฟลาวร์ ฟลาวร์ที่กำจัดเมือกและสตาร์ชของเมล็ดทุเรียนทั้งสองพันธุ์ ดังต่อไปนี้

-กำลังการพองตัวและการละลาย โดยวิธีของ Kong *et al.* (2009)

-ความหนืดและการเปลี่ยนแปลงความหนืด ด้วยเครื่อง Rapid Viscosity Analyzer, RVA โดยวิธีของ Newport Scientific (1998)

-การขับน้ำออกจากเจล (Syneresis) โดยวิธีของ Wang *et al.* (2010)

-ความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture Analyzer โดยวิธีของ Kong *et al.* (2009)

-ความสามารถในการดูดซับน้ำและน้ำมัน (Water and oil absorption capacities) โดยวิธีของ Maninder *et al.* (2007)

-ความสามารถในเกิดอิมัลชัน (Emulsifying capacity, EC) และการรักษาความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion stability, ES) โดยวิธีของ Jitngarmkusol *et al.* (2008)

3.3.2.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองข้อ 3.3.2.1 3.3.2.2 และ 3.3.2.4 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized. Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองในพันธุ์เดียวกันด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (ในตัวอย่างรูปแบบเดียวกัน) โดยใช้ Independent-Sample T-Test

การทดลองในข้อ 3.3.2.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของสมบัติสตาร์ชที่วัดในเชิงปริมาณ (ความหนืดอินทรินสิค อุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนเซชันและการเกิดรีโทรเกรเดชัน) ระหว่างพันธุ์ด้วยวิธี Independent-Sample T-Test

3.3.3 ศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากฟลาวร์เมล็ดทุเรียน

ศึกษาการประยุกต์ใช้ฟลาวร์เมล็ดทุเรียนทั้ง 2 พันธุ์ ในผลิตภัณฑ์มายองเนส ดังต่อไปนี้

3.3.3.1 การเตรียมมายองเนส

เตรียมฟลาวร์เมล็ดทุเรียนทั้งสองพันธุ์ให้อยู่ในรูปของแป้งสุก (แป้งพรีเจล) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ และเตรียมแป้งพรีเจลให้อยู่ในรูปของของเหลวเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในมายองเนส โดยเตรียมมายองเนสสูตรไขมันเต็ม (Full fat, FF) ตามวิธีการของ Ma และ Barbosa-Canovas (1995) ซึ่งใช้เป็นสูตรควบคุม และมายองเนสสูตรทดแทนน้ำมันถั่วเหลือง ด้วยน้ำแป้งพรีเจลจากเมล็ดทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (NF) และพันธุ์ชะนี (CF) ในปริมาณต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3 โดยขั้นตอนในการเตรียมมายองเนส คือ ผสมไข่แดง น้ำส้มสายชู น้ำตาล มัสตาร์ดและเกลือให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์ และปั่นที่ความเร็วระดับ 2 (13,000 รอบต่อนาที) จนไข่แดงและส่วนผสมขึ้นฟูเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำแป้ง (ในสูตรที่ลดไขมัน) สลับกันจนหมด ปั่นต่อด้วยความเร็วระดับ 3 (16,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 7 นาที นำมาบรรจุขวดและปิดฝาให้สนิท

Table 3 ส่วนผสมและสูตรมายองเนส

สูตร	น้ำมันถั่วเหลือง (มิลลิลิตร)	แป้งพรีเจล ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)	ไข่แดง (กรัม)	น้ำส้มสายชู (กรัม)	เกลือ (กรัม)	น้ำตาล (กรัม)	มัสตาร์ด (กรัม)
FF	**80**	**0**	8.2	6	4	0.8	0.5	0.5
NF-M1 CF-M1	**68**	**12**	8.2	6	4	0.8	0.5	0.5
NF-M2 CF-M2	**56**	**24**	8.2	6	4	0.8	0.5	0.5
NF-M3 CF-M3	**44**	**36**	8.2	6	4	0.8	0.5	0.5

3.3.3.2 ศึกษาสมบัติมายองเนส

3.3.3.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและค่าพลังงาน ได้แก่ปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า (AOAC, 2000) ไขมัน (Bligh and Dryer, 1959) คาร์โบไฮเดรต (คำนวณจากการหักลบปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมันและเถ้า จาก 100 เปอร์เซ็นต์) และค่าพลังงานจากสมการ

ปริมาณพลังงาน (kcal) = 4 (%โปรตีน) + 9 (%ไขมัน) + 4 (%คาร์โบไฮเดรต)

3.3.3.2.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของมายองเนส 7 สูตรเปรียบเทียบกับสูตรทางการค้า ได้แก่ SK และ BF

-ขนาดและการกระจายตัวของเม็ดไขมัน โดยวิธีของ Mandala *et al.* (2004)

-พฤติกรรมการไหลและความหนืด โดยวิธีของ Ma และ Barbosa-Canovas (1995)

-การปาดทา (spreadability) โดยวิธีของ Herald *et al.* (2009)

-ความคงตัวของมายองเนส โดยวิธีของ Mandala *et al.* (2004)

3.3.3.3 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี DMRT