

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

##### 3.1.1 วัสดุดิบ

3.1.1.1 ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ได้จากพื้นที่ภายในจังหวัดนครพนม

##### 3.1.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

###### 3.1.2.1 สารเคมี เกรดสำหรับการวิเคราะห์

- (1) กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid; TCA) ยี่ห้อ BDH
- (2) กรดบอริก (Boric acid) ยี่ห้อ Univar
- (3) กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ยี่ห้อ Merck
- (4) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ยี่ห้อ Merck
- (5) คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ Univar
- (6) โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (Anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ยี่ห้อ Univar
- (7) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยี่ห้อ Univar
- (8) โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ยี่ห้อ Univar
- (9) โซเดียมซิเตรท ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ Univar
- (10) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ Merck
- (11) 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ยี่ห้อ Fluka
- (12) ไดโซเดียมฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ยี่ห้อ Univar
- (13) ทริสไฮโดรคลอริก (Triz HCl) ยี่ห้อ Sigma-alrich
- (14) ไทโรลอกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethyl-chloroman-2-carboxylic acid) ยี่ห้อ Fluka
- (15) โบรโมซอลกรีน (Bromocresol green) ยี่ห้อ Univar
- (16) ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) ยี่ห้อ Lab-Scan
- (17) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ยี่ห้อ Univar
- (18) โพแทสเซียมฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ยี่ห้อ Univar
- (19) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) ยี่ห้อ Univar

- (20) เฟอโรซีน (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4'-4''-disulfonic acid)
- (21) เมทิลเรด (Methylred) ยี่ห้อ Univar
- (22) เมทานอล (Methanol) ยี่ห้อ Univar
- (23) เอทานอล (Ethanol) ยี่ห้อ Lab-Scan
- (24) เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ยี่ห้อ BDH
- (25) ไอรอนคลอไรด์ (Iron (II) chloride-4-hydrate ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )) ยี่ห้อ BDH
- (26) 2,2'-เอซีนอบิส (3-เอทิลเบนโซไทโอะซีน-6-ซัลโฟนิกแอซิด) (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS) ยี่ห้อ Fluka

### 3.1.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- (1) Phosphate - buffered dilution water
- (2) Plate Count Agar
- (3) Plate Dextrose Agar

### 3.1.3 อุปกรณ์

- 3.1.3.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB104 บริษัท Metler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3.2 เครื่องบดอาหาร รุ่น Bird E97 บริษัท The Bird MFC ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น Avanti<sup>TM</sup> J25 บริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น pH211 บริษัท Hanna Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3.5 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน รุ่น Kjeltac 1002 Distilling Unit บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน
- 3.1.3.6 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน รุ่น HT 1043 extraction unit บริษัท Tecator ประเทศสวีเดน
- 3.1.3.7 เครื่องสกัดของแข็ง-ของเหลว รุ่น UOP4 บริษัท Armfield ประเทศอังกฤษ
- 3.1.3.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Lambda บริษัท Perkin Elmer spectrometer ประเทศเยอรมัน

- 3.1.3.9 โถดูดความชื้น
- 3.1.3.10 ตู้อบลมร้อน รุ่น U30 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
- 3.1.3.11 เตาให้ความร้อน รุ่น HC502 บริษัท Bibby ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.3.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W29 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
- 3.1.3.13 อุปกรณ์เครื่องแก้วเพื่อใช้ในการทดลอง
- 3.1.3.14 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- 3.1.3.15 ตู้อบฆ่าเชื้อ
- 3.1.3.16 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.1.3.17 เครื่องตีตัวอย่าง
- 3.1.3.18 จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
- 3.1.3.19 ปีเปต
- 3.1.3.20 ตะเกียงอัลกอฮอล์
- 3.1.3.21 แอลกอฮอล์ (70% v/v)
- 3.1.3.22 loop เชื้อเชื้อ
- 3.1.3.23 ปากคืบ
- 3.1.3.24 เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- 3.1.3.25 เครื่องเขย่า (Mixer)
- 3.1.3.27 เครื่อง Laminar Flow

## 3.2 วิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการที่สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม โดยดำเนินการผลิตคุกกี้ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงเพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการผลิตคุกกี้ด้วยวิธีการประเมินพื้นผิวการตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) โดยการวางแผนการทดลองด้วย  $2^2$  central composite design (CCD) เพื่อให้ค่าตอบสนองสูงสุดของปริมาณแอนโทไซยานิน และความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS สูงสุด และผลของการเติมกรดต่อสารไฟโตเคมีคอล ความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่อผลิตภัณฑ์ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completed randomized design; CRD) โดยมีทั้งหมด 24 ทริตเมนต์ กำหนดให้แต่ละทริตเมนต์ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.2.1 การเตรียมแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ในงานวิจัยนี้ใช้เมล็ดข้าวเหนียวสีม่วงในระยะเก็บเกี่ยวและนำไปตากแดดจนแห้งสนิทจากตำบลขามเฒ่า อำเภอมือง จังหวัดนครพนม เป็นวัตถุดิบในการทดลอง นำเมล็ดข้าวโพดแห้งไปบดละเอียดด้วยเครื่องบดโม้ละเอียด (DISK MILL รุ่น AK-45, FFC-45) ซึ่งร้อนผ่านตระแกรงขนาด 80 เมช จากนั้นบรรจุในภาชนะที่แห้งและปิดสนิท ในห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารมหาวิทยาลัยนครพนม วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีซึ่งประกอบด้วย ปริมาณความชื้น ไขมัน เส้นใยหยาบ โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000)

### 3.1.2 การผลิตเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยใช้เครื่องอัดรีดชนิดสกรูเดี่ยว

นำแป้งข้าวและข้าวโพดมาผสมกันตามสัดส่วนที่ต้องการศึกษา จากนั้นเติมน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตามปริมาณที่ต้องการศึกษา (wet basis) ทำการตีส่วนผสมให้เข้ากันในเครื่องผสม ที่ความเร็วรอบต่ำสุด (ระดับที่ 1) นาน 25 นาที และนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมมาผ่านเข้าเครื่องอัดรีดชนิดสกรูเดี่ยว (Single screw extruder) : Polydrive with Rheomex R 252 HAAKE) ซึ่งมีข้อกำหนดของเครื่องดังนี้ ความยาวของบารเรล 476 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของบารเรล 19.1 มิลลิเมตร บารเรลประกอบด้วย 3 โซน เส้นผ่าศูนย์กลางของ die เท่ากับ 2 มิลลิเมตร และความเร็วรอบของสกรูที่ 80 รอบต่อนาทีและความเร็วสกรูสำหรับป้องกันวัตถุดิบที่ 50 รอบต่อนาที โดยอุณหภูมิบารเรล (barrel) แบ่งเป็นโซนที่ 1 2 3 ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของได (die) เท่ากับ 100 องศาเซลเซียส. เส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงหลังผ่านการอัดรีดจะนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความชื้นไม่เกิน 12 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท เก็บไว้ในที่มืดเพื่อจะนำมาวิเคราะห์ในขั้นถัดไป

### 3.1.3 การศึกษาผลของกรดอินทรีย์ต่อคุณภาพของเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ศึกษาผลของชนิดของกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร 3 ชนิดคือ กรดฟิวมาริก (fumaric acid) กลูโคโนเดลตาแลคโตน (Glucono-delta-lactone; GDL) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ต่อการคงตัวของสารไฟโตเคมีคอล ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และคุณภาพสีของผลิตภัณฑ์เส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงโดยเติมกรดทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (โดยน้ำหนักแป้ง) ลงในสูตรมาตรฐาน (สูตรที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต) จากนั้นนำตัวอย่างตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ จุลินทรีย์ และประเมินผลทางประสาทสัมผัส

### 3.1.4 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ต่อความคงตัวของสารไฟโตเคมีคอล ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำผลิตภัณฑ์เส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงที่มีการเติมกรดจากข้อ 2.3 มาบรรจุในถุงพลาสติกที่ปิดสนิทและจัดเก็บที่อุณหภูมิห้อง ทำการสุ่มตัวอย่างทุกสัปดาห์ นาน 1 เดือน จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารไฟโตเคมีคอล ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน และจุลินทรีย์และเชื้อราทั้งหมด

### 3.1.5 การประเมินผลทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง

ผลิตภัณฑ์มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยจะประเมินคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้แก่ สี ความเหนียว เนื้อสัมผัส รสชาติ และความชอบโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9-point hedonic scale โดยให้คะแนนความชอบจาก 1 (ไม่ชอบมากที่สุด) ถึง 9 (ชอบมากที่สุด) โดยผู้ทดสอบที่ไม่ได้ผ่านการฝึกฝนจำนวน 40 คน ซึ่งวางแผนการทดสอบตัวอย่างแบบ (Randomized Completely Block Design, RCBD) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT)

### 3.1.6 วิวิธีวิเคราะห์

#### 1) องค์ประกอบทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างแป้งข้าวโพด แป้งข้าว และผลิตภัณฑ์เส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง ซึ่งประกอบด้วย ความชื้น ไขมัน เส้นใยหยาบ โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2000)

#### 2) ปริมาณค่า pH

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ A-PWCC ตามวิธีของ Li et al. (2013) โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 10 กรัม แล้วนำไปบดให้ละเอียดจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรทิ้งไว้นาน 30 นาที และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (pH211, Hanna Instrument Ltd., USA.)

#### 3) คุณภาพสี

วัดคุณภาพสีของ A-PWCC โดยระบบ Hunter CIE color (CIE, 2004) ประกอบด้วยค่าความสว่าง ( $\Delta L^*$ ) ค่าความเป็นสีแดง ( $a^*$ ) และค่าความเป็นสีเหลือง ( $b^*$ ) โดยใช้โครมามิเตอร์ (Minolta CR-300 series, Japan) จากนั้นประเมินหาค่าความเข้มของสี (chroma;  $C^*$ ), ค่าเฉดสี (hue;  $h$ ) และค่าความแตกต่างโดยรวมของสี ( $\Delta E$ ) โดยคำนวณได้จาก 3 สมการคือ  $C^* =$

$(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ;  $h = \arctan(b^*/a^*)$ ; และ  $\Delta E = (\Delta L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  วัดตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยในแต่ละการวัดจะอ่านค่า 3 ค่า เพื่อหาเฉลี่ย

#### 4) เนื้อสัมผัส

วัดคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงหลังการทำให้สุก โดยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (texture analyzer) โดยนำเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงหลังการทำให้สุกความยาว 5 เซนติเมตร น้ำหนัก 5 กรัม มาต้มในน้ำเดือดปริมาตร 150 มิลลิลิตร นาน 5 นาที นำมาวัดค่าแรงดึง (tension) ที่ crosshead speed เท่ากับ 3.3 มิลลิเมตรต่อวินาที (mm/s)

#### 5) การสูญเสียภายหลังการให้ความร้อน (Cooking loss)

วิเคราะห์ร้อยละการสูญเสียภายหลังการให้ความร้อน (Cooking loss) ของเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วงตามวิธีของ (Baek and Lee, 2014) โดยนำเส้นข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง (ความยาว 5 เซนติเมตร ปริมาณ 5 กรัม) มาต้มในน้ำเดือดปริมาตร 150 มิลลิลิตร นาน 10 นาที จากนั้นนำเส้นหลังการต้มมาสะเด็ดน้ำออกนาน 5 นาที นำน้ำที่ผ่านการต้มเส้นมาอบด้วยเตาอบลมร้อน อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่และชั่งหาน้ำหนัก โดย Cooking loss จะคำนวณจากร้อยละของน้ำหนักน้ำต้มหลังอบแห้งต่อน้ำหนักของเส้นก่อนการต้ม

#### 6) ค่าวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ )

วัดค่า วอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ) ด้วยเครื่อง Aqua lab โดยนำตัวอย่างอาหารบด ด้วยเครื่องบดอาหารให้ละเอียด แล้วนำมาวัดค่าวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ) โดยทำการวัดจำนวน 3 ซ้ำ

#### 7) การสกัดสารไฟโตเคมีคัล

สกัดสารไฟโตเคมีคัลของ A-PWCC ตามวิธีของ Abdel-Aal and Hucl (1999) โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลที่เป็นกรดในอัตราส่วน 1:8 เตรียมสารละลายเอทานอลที่เป็นกรดโดยมีสัดส่วนเอทานอลต่อไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.0 N เท่ากับ 85:15 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเขย่าอย่างต่อเนื่อง แยกส่วนสารผสม ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่  $27,200 \times g$  นาน 15 นาที (Centrifuge refrigerator, AVANTI™ J25, Beckman Ltd., USA.) นำสารละลายส่วนใสด้านบนไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary evaporator, BUCHI R-114, BUCHI Corp., USA.) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทดลองขั้นต่อไป

### 8) ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยการเจือจางตัวอย่างสารสกัดที่ pH แตกต่างกัน ตามวิธีของ Wrolstad (1982) นำสารตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองจำนวน 2 หลอด หลอดแรกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ที่ pH 1.0 ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร และหลอดที่ 2 เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตรท ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) ที่ pH 4.5 ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที นำสารผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และใช้น้ำกลั่นเป็นหลอดควบคุม ลำดับต่อมาเตรียมสารแอนโทไซยานินและวัดค่าในช่วงเวลา 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง หาปริมาณสารแอนโทไซยานินเทียบกับสาร ไซยานิดิน-3-ไกลโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) โดยเริ่มต้นคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสง (A) ของตัวอย่างจากสูตร  $A = (A_{520} - A_{700})$  ที่ pH 1.0 -  $(A_{520} - A_{700})$  ที่ pH 4.5 โดยกำหนดให้  $A_{520}$  เป็นความยาวคลื่นที่ตัวอย่างดูดกลืนแสงได้สูงสุด จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดจากสูตร  $\text{TAC} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$  กำหนดให้ DF คือค่าการเจือจาง (Dilution factor) MW คือน้ำหนักโมเลกุลของไซยานิดิน-3-ไกลโคไซด์ (449.2) และ  $\epsilon$  คือค่าโมลาร์ แอ็บซอร์บติวิตี (Molar absorptivity) (26,900 ลิตร/โมล/เซนติเมตร) และรายงานผลเป็น  $\mu\text{g CE/g dry sample}$

### 9) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ตามวิธีของ Nurhanan and Wan Roli (2012) โดยพิจารณาการเกิดสีของอลูมิเนียมคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ ) นำสารสกัดปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายโซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_2$ ) เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสารผสมเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; LAMBDA 25, Perkin Elmer, Inc., Germany) ใช้เคอร์เซทิน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐานและคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น  $\text{mg QE/g dry sample}$

### 10) ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPN) ตามวิธีของ Inglett et al. (2011) นำสารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{NaCO}_3$ ) เข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ทั้งสารผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมงและในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; LAMBDA 25, Perkin Elmer, Inc., Germany) หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) และรายงานผลเป็น mg GE/g dry sample

### 11) ปริมาณการต้านอนุมูล ABTS

วิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูล 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS-RSA) ตามวิธีของ Yin et al (2005) เตรียมอนุมูล ABTS โดยนำสารละลาย ABTS เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 7.0 มาผสมกับสารละลายโพแทสเซียมซัลเฟต ( $K_2S_4O_8$ ) เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรที่เท่ากัน เติมน้ำกลั่นอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์หาปริมาณการต้านอนุมูล ABTS โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโทรล็อก (Trolox) กับความสามารถในการยับยั้งของอนุมูล ABTS รายงานผลเป็น mg TE/g dry sample

### 12) ปริมาณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านออกซิเดชัน (Ferric reducing/antioxidant power; FRAP)

วิเคราะห์ค่า FRAP โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยเติมตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลาย FRAP จะประกอบด้วย TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ผสมด้วย  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ acetate buffer pH 3.6 เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาค่า FRAP โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโทรล็อก (Trolox) รายงานผลเป็น mg TE/g dry sample

### 13) ปริมาณการจับกับเฟอร์รัสไอออน

วิเคราะห์ปริมาณการจับกับเฟอร์รัสไอออน ตามวิธีของ Yin et al (2005) โดยนำสารละลายตัวอย่างหรือตัวควบคุมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมด้วยเมทานอลปริมาตร 3.7 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์รอสคลอไรด์ ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นละลายเฟอโรซีน (Ferrozine) (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid monosodium salt) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1



มิลลิลิตร ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำสารผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หาปริมาณความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน ( $\text{Fe}^{2+}$ ) โดยสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ EDTA (Ethylenediminetetraacetic acid) กับความสามารถในการยับยั้งเฟอร์รัสไอออนและรายงานผลเป็น  $\mu\text{g EDTA/g dry sample}$

#### 14) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ (TPC) และปริมาณเชื้อราทั้งหมด (TFC) โดยวิธีการ Pour plate ใช้อาหาร Plate count agar (PCA) และ potato dextrose agar ตามวิธี AOAC (AOAC, 2000) รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g)

#### 3.1.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทดลอง Central composite design (CCD) เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมที่ให้ค่าตอบสนองสูงสุดด้วยโปรแกรม Design Expert software version 5.08 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS statistic program (Version 17) แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.3 สถานที่ทำการวิจัย

3.1 ห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม

3.2 ห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.3 ห้องปฏิบัติการเคมี ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น