บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

รำข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุงซึ่งผ่านการสกัดน้ำมัน (ภาพที่ 3.1) จากบริษัทบ้านไทยเฮิร์บ จำกัด อ.ควนขนุน จ.พัทลุง โดยบรรจุในถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน (Polyethylene: PE) และปิดผนึกถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาศึกษาภายในระยะเวลา 12 เดือน

ภาพที่ 3.1 รำข้าวสังข์เมืองหยดพัทลุงที่ผ่านการสกัดน้ำมัน

3.1.2 สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether, Labscan, Thailand)
2. กรดบอริก (H_3BO_3) (boric acid, Merck, Germany)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (sodium hydroxide, Merck, England)
4. เมทิลเรด ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) (methyl Red, Panreac, span)
5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (hydrochloric acid, Ajax, New Zealand)
6. กรดแอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$)(ascorbic acid, Sigma, Germany)
7. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) (disodium hydrogen phosphate, Ramkem, India)
8. 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine (TPTZ, Germany)
9. เอทานอล (C_2H_5OH) (ethanol, Merck, England)
10. เกลือโซเดียมแอซิเตต ($C_2H_3NaO_2$) (sodium acetate, Ramkem, India)
11. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) (sulfuric acid, Merck, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ($CH_3(CH_2)_{11}SO_4^-Na^+$) (sodium dodecyl sulphate, Merck, Germany)
13. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical, Sigma, Germany
14. กรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH) (trichloroacetic acid, Fisher, UK)
15. เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) (ferric chloride, Lobal, India)

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 decimal point analytical balance, Santorius model, CP224S, Germany)
2. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (microprocessor pH meter, Hanna Instruments, Modle HI 9021, USA.)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmert, Model UNE 400, Germany)
4. เครื่องวิเคราะห์ลักษณะสัมผัส (texture analyzer (TA.XT2, Stable Micro System, UK)
5. กระป๋องหาความชื้น (moisture can)
6. ถ้วยกระเบื้อง (crucible)
7. เตาเผาเถ้า (furnace, Carbolite, England)
8. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hotplate stirrer, Severin, Germany)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water Bath, Memmert, Germany)
10. เครื่องกวนสาร (overhead stirrer, yellow line, Germany)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge, Heraeus, Megafuge 1.0R, Germany)
12. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl extraction, Gerhardt, Germany)
13. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet extraction, Gerhardt Germany)
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, DU 7500 , Beckman, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากรำข้าว

1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

นำรำข้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมันมาวิเคราะห์หาค่าทางเคมี (Proximate Analysis) โดยหาค่าคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ปริมาณเส้นใย เถ้า และความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000)

1.2 การสกัดโปรตีนจากรำข้าวสกัดโปรตีนจากรำข้าวโดยวิธีสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ด้วยอัตราส่วนรำข้าวต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 ตามวิธีของ Issara *et al*. (2008) โดยมีขั้นตอนปัจจัยและกระบวนการสกัดดังภาพที่ 3.2

รำข้าว

↓

เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นตามกำหนดในตารางที่ 3.1

↓

คนต่อเนื่องที่อุณหภูมิต่างๆ และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาตามกำหนดในตารางที่ 3.1

↓

กรองและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

↓

นำส่วนใสมาปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายผสมให้ได้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์

↓

อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

↓

โปรตีน

ภาพที่ 3.2 กระบวนการสกัดโปรตีนจากรำข้าวสกัดน้ำมัน

ที่มา: Issara *et al*. (2008)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การศึกษาปัจจัยของสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากรำข้าวเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด โดยวิธีการสกัดด้วยสารละลายด่าง โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) โดยทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Rotatable Central Composite Design (R-CCD) แบบมี 3 ปัจจัย 5 ระดับ เพื่อศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิและเวลาในการสกัด

โดยกำหนดปัจจัย ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.05-0.2 โมลาร์) อุณหภูมิในการสกัด (30-60 องศาเซลเซียส) และเวลาในการสกัด (60-240 นาที) (ประยุกต์จากLi Xin *et al*., 2010) ออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด (-α) ระดับต่ำ (-1) ระดับกึ่งกลาง (0) ระดับสูง (+1) ระดับสูงสุด (+α) โดยค่าของตัวแปรทั้ง 5 ระดับของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ 3.1 และแผนการทดลองของสภาวะในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวในระดับต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อุณหภูมิ และเวลาในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวในระดับต่างๆ

ปัจจัย	(-α)	(-1)	(0)	(+1)	(+α)
A: ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	0.05	0.08	0.125	0.17	0.2
B: อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส)	30	36	45	54	60
C: เวลาในการสกัด (นาที)	60	96.5	150	203.5	240

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลอง Rotatable Central Composite Design ของสภาวะในการทดลองการสกัดโปรตีนจากรำข้าว

สิ่งทดลองที่	ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์) (X_1)	อุณหภูมิในการสกัด (องศาเซลเซียส) (X_2)	เวลาในการสกัด (นาที) (X_3)
1	0.08	36	96.5
2	0.17	36	96.5
3	0.08	54	96.5
4	0.17	54	96.5
5	0.08	36	203.5
6	0.17	36	203.5
7	0.08	54	203.5
8	0.17	54	203.5
9	0.05	45	150
10	0.2	45	150
11	0.125	30	150
12	0.125	60	150
13	0.125	45	60
14	0.125	45	240
15	0.125	45	150
16	0.125	45	150
17	0.125	45	150

นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000) และนำผลข้อมูลปริมาณโปรตีนของสภาวะในการสกัดที่ได้ไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ แบบ 8 polynomial Model (สมการที่ 3.1) และหาค่า regression coefficient จาก multiple linear regression

$$Y = \beta_0 + \Sigma \beta_i X_i + \Sigma \beta_{ii} X_i^2 + \Sigma\Sigma \beta_{ij} X_i X_j + £ \qquad (3.1)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยที่ X_1, X_2 และ X_3 เป็นตัวแปรอิสระที่มีผลต่อค่า Y

β_0 , β_1, (i=1, 2, 3), β_{ii} , (i=1, 2, 3), βij , (i=1, 2, 3; j=2, 3) และ £ เป็นค่า regression coefficient สำหรับ intercept, linear, quadratic, cross-product และ model ตามลำดับ

จากนั้นใช้โปรแกรม Minitab Statistical Software สำหรับการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป และสร้างกราฟความสัมพันธ์ของปัจจัยในการสกัดต่อปริมาณโปรตีน โดยใช้ response surface model plot ด้วยโปรแกรม STATISTICA Kernel Release 7.0.61.0 EN (StatSoft Inc., Tulsa, OK) สำหรับ Windows

1.4 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าว

นำโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 1.3 มาวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2, 4, 6, 8 และ 10 โดยวางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD)

1.4.1 ความสามารถในการละลายของโปรตีน ตามวิธีของ Kakali *et al*. (2008) โดยเตรียมสารละลายของโปรตีนจากรำข้าวให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 2, 4, 6, 8 และ10 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นคนเบาๆ อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000) แล้วคำนวณหาค่าความสามารถในการละลายของโปรตีน

$$\text{การละลายของโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในสารละลายใส} \times 100}{\text{ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง}} \qquad \ldots\ldots (3.1)$$

1.4.2 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ตามวิธีของ Pearce and Kinsella (1979) โดยนำน้ำมันพืช 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีนจากรำข้าวตัวอย่างเข้มข้นร้อยละ 0.1 แล้วปรับพีเอชให้ได้ 2, 4, 6, 8 และ 10 นำมาโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วพักไว้ ทำการทดสอบโดยปิเปตส่วนที่เป็นอิมัลชันปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่เวลา 0 และ 10 นาที แล้วผสมกับสารละลาย sodium dodecyl sulphat (SDS) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ($Abs_{500\ nm}$) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ t=0 นาที ……. (3.2)

$$\text{ความคงตัวของอิมัลชัน (นาที)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ t=0 นาที x 10 (นาที)}}{\text{ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ t=0 นาที และ t=10 นาที}} \quad \text{……. (3.3)}$$

1.4.3 ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัว ตามวิธีของ Okeziet and Bello (1988) โดยนำสารละลายตัวอย่างเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 2, 4, 6, 8 และ 10 จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เพื่อทำให้เกิดฟองเป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายฟองที่เกิดขึ้นลงในกระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร อ่านปริมาตรของฟองทันที แล้วนำไปคำนวณค่าความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง

$$\text{ความสามารถในการเกิดฟอง (\%ปริมาตร)} = \frac{\text{ปริมาตรฟองเริ่มต้น (มิลลิลิตร) x 100}}{\text{ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย (มิลลิลิตร)}} \quad \text{…….(3.4)}$$

$$\text{ความคงตัวของฟอง (นาที)} = \frac{\text{ปริมาตรของฟองเริ่มต้นที่เวลา t=0 (มิลลิ ลิตร) x 10}}{\text{ผลต่างของปริมาตรของฟองที่เวลา t=0 และ t=10 (มิลลิลิตร)}} \quad \text{…….(3.5)}$$

การทดลองที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนรำข้าว โดยการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ดังภาพที่ 3.3 โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial in Central Composite Design ซึ่ง k คือปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากโปรตีนรำข้าว ซึ่งเตรียมโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อทำการศึกษาปริมาณของเอนไซม์และเวลาการย่อยที่เหมาะสม ในการศึกษาใช้อุณหภูมิและพีเอชของการย่อยที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (50 องศาเซลเซียสและระดับความเป็นกรด-ด่าง 7.0) และใช้โปรตีนรำข้าวเข้มข้นร้อยละ 10

โดยกำหนดปัจจัย ปริมาณเอนไซม์ และเวลาการย่อยออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด (-α) ระดับต่ำ (-1) ระดับกึ่งกลาง (0) ระดับสูง (+1) ระดับสูงสุด (+α) กำหนดให้ $\alpha = \pm 2^{(k-p)/4} = 1.414$ เมื่อ k คือจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาและ p คือ Fractionalization Element (ในที่นี้เท่ากับ 0) โดยค่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของตัวแปรทั้ง 5 ระดับของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ 3.3 และแผนการทดลองของสภาวะในการสกัดโปรตีนจากรำข้าวในระดับต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีนรำข้าวในระดับต่างๆแสดงดังนี้

ปัจจัย	(-α)	(-1)	(0)	(+1)	(+α)
A: เอนไซม์ (%w/w)	0.5	1.0	2.25	3.5	4.0
B: เวลาย่อย (นาที)	5	17.5	47.5	77.5	90

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลอง 2^2 Factorial Experimental in Central Composite Design ของสภาวะในการทดลองการย่อยโปรตีนรำข้าวด้วยเอนไซม์ด้วยฟลาโวไซม์

สิ่งทดลองที่	ปริมาณเอนไซม์ (%w/w)	เวลาย่อย (นาที)
1	1.0	17.5
2	3.5	17.5
3	1.0	77.5
4	3.5	77.5
5	0.5	47.5
6	4.0	47.5
7	2.25	5
8	2.25	90
9	2.25	47.5
10	2.25	47.5
11	2.25	47.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีนรำข้าว

↓

ผสมกับ Mcllvaine buffer ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ในอัตราส่วนร้อยละ 10

↓

เติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ระดับต่างๆ และคนอย่างต่อเนื่อง
และทำการเก็บตัวอย่างตามระยะเวลาย่อยที่กำหนดตามตารางที่ 3.4

↓

หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที

↓

กรองด้วยกระดาษกรองหมายเลข 4 เพื่อแยกรำข้าวออกจากสารละลาย

↓

สารละลายที่แยกได้นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

↓

นำสารละลายส่วนใส อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

↓

โปรตีนไฮโดรไลเสตแห้ง

ภาพที่ 3.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตแห้ง
ที่มา : Yean *et al*. (2008)

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายแล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากระดับการย่อยสลายที่ดีที่สุด เพื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตสำหรับการทดลองในข้อต่อไป และนำผลข้อมูลที่ได้ไปสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ สมบัติทางเคมีกายภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย

2.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) ของโปรตีนรำข้าวซึ่งผ่านการย่อยตามวิธีของ Hoyle และ Merritt (1994) โดยนำโปรตีนรำข้าวที่ได้ผสมกับกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้นร้อยละ 20 (โดยน้ำหนัก) ในอัตราส่วน 1:10 เขย่าให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสที่ได้หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000)

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากรำข้าว

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ แล้วนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดได้จากรำข้าวที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

2.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธี Brand and Williams (1995) โดยละลายสารตัวอย่างความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายของ DPPH ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 500 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

2.2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) ตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยละลายสารตัวอย่างความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 150 ไมโครลิตรผสมกับสารลาย FRAP (10 mM (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine+300 mM sodium acetate (pH 3.6)+ 20 mM ferric chloride) 2,850 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

2.3 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ทำการทดสอบความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ความสามารถในการเกิดฟองและความคงตัวของฟอง ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้ตามข้อ 1.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 การศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากรำข้าวเพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลและเพิ่มกิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ลำไยอบแห้ง

• การเตรียมลำไยอบแห้ง

ทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ลำไยอบแห้งดังแผนภาพที่ 3.4 โดยใช้ลำไยสายพันธุ์อีดอจากสวนนาง ราตรี ไชยมงคล อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

คัดเลือกผลลำไยที่สมบูรณ์ไม่เน่าเสียหรือไม่แก่จัดเกินไป

↓

แกะเปลือกและคว้านเอาเมล็ดออก

↓

นำเนื้อลำไยที่ได้ล้างน้ำให้สะอาด

↓

นำเนื้อลำไยที่ล้างสะอาดแล้วไปแช่ในสารละลายดังตารางที่ 3.5
ด้วยอัตราส่วนเนื้อลำไยต่อสารละลายเท่ากับ 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แช่นาน 5 นาที

↓

นำเนื้อลำไยที่ผ่านการแช่มาสะเด็ดน้ำ

↓

เรียงผลลำไยคว่ำลงบนตะแกรง รองด้วยผ้าขาวบางที่สะอาดโดยไม่ให้ซ้อนกัน

↓

นำไปอบในตู้อบลมร้อนแบบถาด (tray dryer)
ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง

↓

อบต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง
ปิด heater รอจนเย็นแล้วจึงนำออกจากตู้อบ

↓

นำมาผึ่งให้เย็นโดยวางบนโต๊ะที่สะอาด บรรจุลงถุงพลาสติก
เพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

ภาพที่ 3.4 กระบวนอบแห้งลำไย
ที่มา: ประยุกต์จากพิชญา (2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 สารละลายที่ใช้ในการแช่ลำไยก่อนการนำไปอบแห้ง

สิ่งทดลอง	สารละลาย
1	น้ำ
2	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.05
3	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.1
4	กรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1
5	โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้นร้อยละ 0.2
6	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ร่วมกับ กรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1
7	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.1ร่วมกับ กรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1
8	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ร่วมกับ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้นร้อยละ 0.2
9	โปรตีนไฮโดรไลเสตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เข้มข้นร้อยละ 0.2

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.1.1 วิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่างของลำไยอบแห้งด้วยเครื่อง pH meter (AOAC, 2000) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 20 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาทีจนเนื้อลำไยอบแห้งเริ่มนิ่ม ปั่นตัวอย่างเนื้อลำไยอบแห้งให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาณสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของลำไยอบแห้งตามวิธีการ AOAC (2000)

3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพ

3.2.1 การวิเคราะห์สีของเนื้อลำไยอบแห้ง

ทำการวัดค่าสีของเนื้อลำไยอบแห้งด้วยเครื่องวัดสี Minolta Chroma รุ่น CR-410 โดยนำลำไยวางบนแผ่นวางตัวอย่างซึ่งมีช่องรูให้แสงผ่าน โดยวัดเนื้อลำไยทีละลูก ในแต่ละลูกวัด 3 จุด คือ วัดรอบลูกลำไย ในการทดลองนี้วัดทั้งหมด 10 ลูกแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย รายงานผลที่ได้ในรูป L*, a* และ b*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 วิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture analysis)

ทำการวัดเนื้อสัมผัสของลำไยโดยใช้เครื่อง texture analyzer (TA.XT2, Stable Micro System, UK) โดยใช้หัววัดชนิด warner-bratzler blade ค่าแรงเฉือน (shear force) อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของหัววัดเท่ากับ 2 มิลลิเมตรต่อวินาที โดยอ่านค่าแรงเฉือน (shear force, N)

คัดเลือกลำไยอบแห้งจากตารางที่ 3.5 โดยใช้สมบัติทางเคมีกายภาพด้านสีโดยคัดเลือกลำไยอบแห้งในสิ่งทดลองที่มีสีเหลืองทองที่สุดและลำไยอบแห้งจากท้องตลาด 2 ยี่ห้อมาวิเคราะห์เปรียบเทียบดังนี้

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

นำลำไยอบแห้งซึ่งคัดเลือกจากข้อ 3.2 และลำไยอบแห้งซึ่งจำหน่ายทางการค้าในท้องตลาดจำนวน 2 ยี่ห้อ มาวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระดังต่อไปนี้

3.3.1 การทดสอบกิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธี Brand and Williams (1995) ตามวิธีในข้อ 2.2.1

3.3.2 การทดสอบกิจกรรมการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) โดยดัดแปลงจากวิธี Benzie and Strain (1996) ตามวิธีในข้อ 2.2.2

3.4 การทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัส

นำลำไยอบแห้งซึ่งคัดเลือกในข้อ 3.2 มาทำการทดสอบความชอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกับลำไยอบแห้งชุดควบคุม (อบแห้งโดยไม่แช่น้ำ) และผลิตภัณฑ์จากท้องตลาด 2 ยี่ห้อ โดยวิธี 9 Point Hedonic Scale โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน (กลุ่มประชากรนักศึกษา คณาจารย์ และบุคลากร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) โดยทดสอบในปัจจัยด้านความชอบโดยรวม กลิ่น รสชาติโดยรวม รสขมและสี

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตอนที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ Rotatable Central Composite Design

ตอนที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Central Composite Design

ตอนที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากตอนที่1 และ 2 โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) ส่วนข้อมูลตอนที่ 3 วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved