บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV/VISIBLE Spectrophotometer รุ่น SPE CORD 40 ยี่ห้อ Analytik Jena AG, Germany)
2. เครื่องปั่นกวนระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer; LD-846, Netherlands)
3. เครื่องบดเมล็ดข้าว (Cyclone sample mill ยี่ห้อ UDY,USA)
4. เครื่องชั่ง ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, PB 23002-S, Switzerland)
5. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, PB 204-S, Switzerland)
6. ตู้ดูดไอสารเคมี
7. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven; UM 500, Memmert, Germany)
8. เครื่อง vortex
9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Varisspeed centrifuge, 1020D series ยี่ห้อ Centurion, United Kingdom)
10. โถควบคุมความชื้น
11. เครื่อง Texture analyzer รุ่น TA.XTplus
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Water bath)
13. เครื่องวัดสี รุ่น ColorQuest XE Hunter Lab, USA
14. ตู้ถ่ายเชื้อ
15. เตาให้ความร้อน (Hot plate)
16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น HL-341
17. อุปกรณ์รมไอเอทานอล แสดงในภาคผนวก ก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการรมข้าวกล้องตัวอย่างละ 500 กรัมด้วยไอของเอทานอล (95% v/v) ร่วมกับ BHT ความเข้มข้นระดับต่างๆ 4 ระดับ คือ 0 g/ml, 0.01 g/ml, 0.02 g/ml และ 0.03 g/ml ทำการรมเป็นระยะเวลานาน 10, 15 และ 20 นาที แล้วนำมาแบ่งบรรจุถุงละ 100 กรัม เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี และคุณภาพในการหุงต้มของข้าวกล้อง รวมทั้งปริมาณของเชื้อราและแบคทีเรียของแต่ละกรรมวิธีการเก็บรักษา ในแต่ละเดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือน

สำหรับภาชนะบรรจุที่ใช้นั้นได้ส่งตัวอย่างถุงพลาสติกชนิดไนลอนลามิเนท (nylon laminate) ถุงพลาสติกชนิดโพลีไวนิลลิดีนคลอไรด์หรือพีวีดีซี (polyvinylidene chloride ; PVdC) ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil)ไปตรวจสอบประสิทธิภาพที่ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นจึงพิจารณาค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซ โดยเลือกใช้ถุงพลาสติกที่มีอัตราการซึมผ่านของก๊าซน้อยที่สุด นั่นคือ ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การเปรียบเทียบอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนบนแผ่นฟิล์ม

ตัวอย่างฟิล์ม	ความหนา (µm)	ค่าวัดการผ่านของก๊าซ ($cm^3/m^2.d.Pa$)
Nylon	85	1.150×10^{-3}
PVdC	70	3.024×10^{-4}
Aluminum foil	110	3.227×10^{-6}

ที่มา : ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การเตรียมวัตถุดิบ

นำข้าวเปลือกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากสหกรณ์การเกษตรสันป่าตอง อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ไปกะเทาะเปลือกและสีเป็นข้าวกล้อง นำมาเข้าตู้อบเพื่อเพิ่มอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิตู้อบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แบ่งใส่บีกเกอร์ในชุดรมไอเอทานอลบีกเกอร์ละ 500 กรัม ปิดด้านบนด้วยกระดาษฟอยล์ที่เจาะรูเอาไว้ สำหรับด้านในของบีกเกอร์นั้นจะมีตะแกรงแสตนเลสที่เจาะรูพรุนวางไว้สูงห่างจากก้นบีกเกอร์ประมาณ 2 ซม. ที่ฐานของบีกเกอร์จะมีรูต่อสายยางซิลิโคนกับ suction flask ที่มีสารละลายเอทานอล 95 % และ BHT ในระดับความเข้มข้นต่างๆ นำบีกเกอร์ที่ใส่ข้าวกล้องไว้แล้วไปวางไว้ใน water bath แล้ววาง suction flask บน Hot plate ใช้ระดับความร้อนที่ 2 ทำการรมเป็นระยะเวลานาน 10, 15 และ 20 นาที หลังจากนั้นนำข้าวกล้องออกมาทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เสร็จแล้วแบ่งบรรจุใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ถุงละ 100 กรัม ก่อนปิดผนึกด้วยความร้อน แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติเป็นเวลา 6 เดือน ที่สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติของข้าวกล้อง

3.4.1 คุณภาพทางเคมี

3.4.1.1 เปอร์เซ็นต์กรดไขมันอิสระ (free fatty acid)

(Peter and Claudio, 1991; Lam, 2003)

1. นำ 50 mM bis(2-ethylhexy) sodium sulfosuccinate (AOT) ใน isooctane จำนวน 50 มิลลิลิตร 0.1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane pH 9.0 จำนวน 0.375 มิลลิลิตร และ 2 mM phenol red in 0.1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane pH 9.0 จำนวน 0.125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนได้เป็นสารละลาย A

2. ชั่งข้าวกล้องจำนวน 10 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร

3. เติม isopropanol จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 2000 rpm แล้วเติม isopropanol ลงไปอีก 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที ที่ความเร็วรอบ 2000 rpm ตั้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอน

4. ดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใส่ลงในหลอด centrifuge แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ดูดเฉพาะส่วนใสจำนวน 30 ไมโครลิตร ลงไปใน cuvett ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6. เติมสารละลาย A ลงไปใน cuvett เขย่าให้เข้ากัน 1 นาที

7. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

8. อ่านค่าเทียบกับกราฟมาตรฐานของค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโอเลอิกที่ทราบความเข้มข้น (ภาคผนวก ข)

3.4.2.2 ปริมาณ Conjugated diene hydroperoxides

ประยุกต์มาจากวิธีของ Angelo *et* al. (1972)

1. นำข้าวกล้องมาบดให้เป็นแป้งร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh แล้วชั่งแป้งมา 0.5000 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตรขนาดความจุ 250 มิลลิลิตรที่แห้งสนิท เติมเฮกเซน (HPLC grade) 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเชกเกอร์ นาน 30 นาที

2. กรองสารละลายที่ได้ผ่าน syringe filter 0.45 ไมครอน

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer) ที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ conjugated diene hydroperoxides

$$\text{CDHP} = \left[\frac{\text{Absorbance}}{24{,}500\ \text{L/mol cm}}\right]\left[\frac{10^{-3}}{\text{ml}}\right]\left[\frac{10^{6}\ \mu\text{moles}}{\text{mole}}\right]\left[\frac{25\ \text{ml}}{0.5\ \text{g}}\right]\ \mu\text{moles/ g}$$

3.4.2 คุณภาพทางกายภาพ

3.4.2.1 สีของข้าวกล้อง

ใช้เครื่องวัดสี Colorimeter ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น ColorQuestXE ซึ่งวัดออกมาในรูปของค่า L* , ค่า a* และค่า b*

ค่า L* คือ ค่าความเข้มสว่างของสี ซึ่งมีค่าเริ่มตั้งแต่ 0 ถึง 100 ค่า L* มีค่ามากแสดงว่าสีมีความสว่างมาก และถ้า L* เท่ากับ 0 จะเป็นสีดำ

ค่า a* คือ ค่าแสดงระดับสีแดงและสีเขียว ถ้า a* มีค่าเป็นบวกแสดงถึงสีแดง มีค่าเป็นลบแสดงถึงสีเขียว เมื่อห่างจากจุด 0 มากแสดงถึงค่าสีแดงหรือสีเขียวมากขึ้น

ค่า b* คือ ค่าแสดงระดับสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้า b* มีค่าเป็นบวกแสดงถึงสีเหลือง มีค่าเป็นลบแสดงถึงสีน้ำเงิน เมื่อห่างจากจุด 0 มากแสดงถึงค่าสีเหลืองหรือสีน้ำเงินมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 คุณภาพการหุงต้มของข้าวกล้อง

3.4.3.1 ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) Champagen *et al*., (1998)

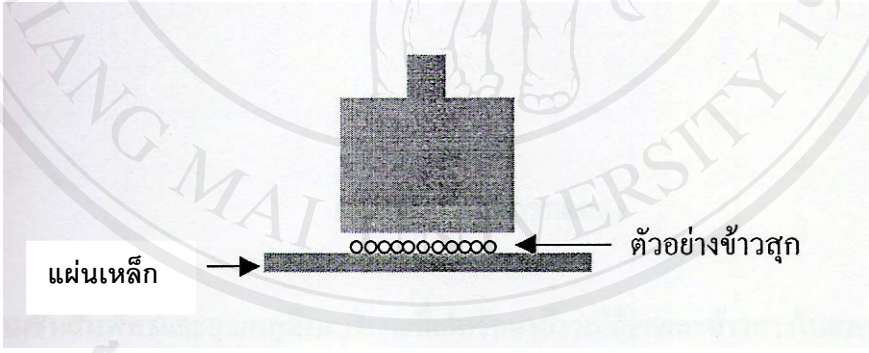
วัดโดยการใช้เครื่องมือวัดวิเคราะห์ความนุ่มและความเหนียวของข้าวสุก (texture profile analysis) โดยใช้หัวกดทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ตั้งให้ระยะห่างจากตัวอย่าง 5 มิลลิเมตร ความเร็วรอบของหัวกดขณะทำการทดสอบ 1 มิลลิเมตร/วินาที ความเร็วรอบของหัวกดหลังการทดสอบ 1 มิลลิเมตร/วินาที กดชิ้นตัวอย่างเป็นระยะทาง 4.9 มิลลิเมตร

วิธีวิเคราะห์

1. หุงข้าวโดยใช้ซึ้งนึ่งบน hot plate ที่ระดับความร้อนที่ 5 นำข้าวกล้อง 15 กรัม ใส่ขวดแก้ว แล้วเติมน้ำ 18 มิลลิลิตร ใช้เวลานึ่งนาน 25 นาที

2. หลังจากข้าวสุกแล้วทิ้งไว้ 10 นาที แล้วสุ่มข้าวสุกจากขวดแก้ว โดยเลือกข้าวสุกจากบริเวณกลางของชั้นข้าวสุกเพื่อให้เกิดความสม่ำเสมอในการวัด

3. เรียงเมล็ดข้าวสุกบนแผ่นเหล็กโดยใช้ตัวอย่างข้าวสุก 10 เมล็ด วางให้เต็มพื้นที่วงกลมวงแรกวางเรียงเพียงชั้นเดียว ทำการวัดดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างขณะทำ texture profile analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อราและแบคทีเรีย

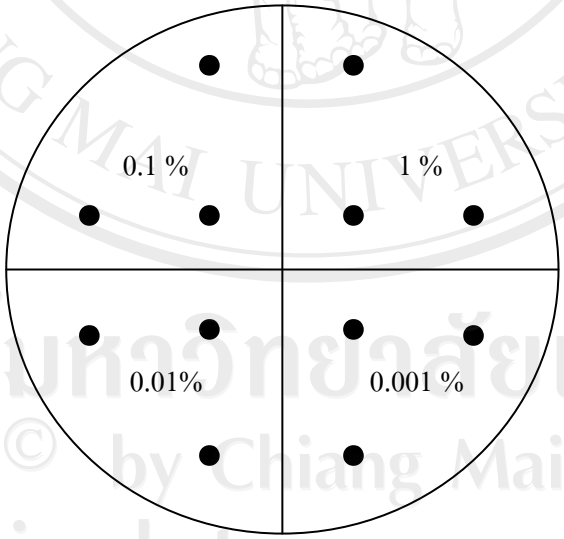
3.4.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อรา

การเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น (Agar method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999)

สุ่มเมล็ดข้าวกล้องไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) นำเมล็ดข้าวกล้องมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดข้าวกล้องใน 1% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้คีมคีบ (forcep) ลนไฟฆ่าเชื้อคีบเมล็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหาร วางเมล็ดทั้งหมดจำนวน 400 เมล็ด โดยแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำการเพาะเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญออกมาจากเมล็ด

3.4.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรีย

ประยุกต์มาจากวิธีของ Miles and misra (1938) โดยเทคนิคการหยดสารละลายที่แช่เมล็ดข้าวกล้องบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar



ภาพที่ 3.2 แผนผังการหยดสารละลายข้าวกล้องที่ความเจือจางต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำเมล็ดข้าวกล้อง 10 กรัมแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร นาน 2 ชั่วโมง ทำการเขย่าทุก 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่มีความเจือจาง 1 %, 0.1 %, 0.01% และ 0.001 % ตามลำดับ หยดสารละลายที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยหยดจุดละ 10 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 3 จุด ดังแสดงในภาพที่ 3.2 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญในแต่ละความเจือจางของสารละลาย

3.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance) ของตัวแปรที่ศึกษา และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (comparison of means) โดย Least Significant Difference (LSD) โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม Statistix for Window version 8.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved