บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ข้าวเปลือกข้าวหอมมะลิ 105 จากสถานีวิจัยเกษตร เขตชลประทาน จังหวัดเชียงใหม่ ปลูกในช่วงเดือนกรกฎาคม - สิงหาคม 2551 และเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม 2551 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของข้าวเปลือกด้วยวิธี AOAC (2000)

3.2 สารเคมี

1. เอนไซม์เซลลูเลส ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus niger*, analytical grade, activity = 0.83 U/mg (Sigma, USA)
2. น้ำกลั่น (โพลสตาร์, ประเทศไทย)
3. Ammonium hydroxide (NH_4OH) (Analar, England)
4. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_20$) (Rankem, India)
5. Diethyl ether ($C_2H_5OC_2H_5$) (Panreac, Spain)
6. Ethanol (C_2H_5OH) (Merck, Germany)
7. Gum arabic powder GD008 (Starlight products, France)
8. Hexanes ($CH_3(CH_2)_4CH$) (Labscan, Thailand)
9. Methanol (CH_3OH) (Labscan, Thailand)
10. Petroleum ether จุดเดือด 30-40 องศาเซลเซียส (J.T. Baker, Thailand)
11. Phenolphthalein ($C_{20}H_{14}O_4$) (Merck, Germany)
12. Potassium phosphate buffer pH 7.0 (Merck, Germany)
13. Potassium hydroxide (KOH) (Ajax Finechem, Australia)
14. Sulfuric acid (H_2SO_4) (J.T. Baker, Thailand)
15. Sodium hydroxide (NaOH) (Labscan, Thailand)
16. Tributyrin ($C_{15}H_{26}O_6$) (Fluka, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องกะเทาะเปลือกข้าวขนาดทดลอง (Satake, Japan)

2. เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Chroma Meter CR300 Series, Minolta, Japan)

3. เครื่อง Texture Analyzer (TA.XT Plus, Stable Micro Systems Ltd., England)

4. เครื่อง Differential Scanning Calorimetry (Perkin Elmer รุ่น Pyris Diamond DSC, Perkin Elmer inc., USA)

5. เครื่องอังไอน้ำ (water bath) (GFL รุ่น 1032, Gessellschaft Fur Labortechnik, Germany)

6. หม้อหุงข้าวไฟฟ้า (Otto Model CR-110, Thailand)

7. ไมโครเวฟ กำลังวัตต์สูงสุด 805 วัตต์ (LG รุ่น Wavedom, LG electronic Co.Ltd, Thailand)

8. ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า (Hot air oven) (Memmert รุ่น ULM500, Memmert, Germany)

9. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle, Germany)

10. โถดูดความชื้น (Dessicator) ที่มี silica gel

11. ตู้เย็น (Sanyo, Thailand)

12. เครื่องปั่น (Philips รุ่น Twist, Indonesia)

13. เครื่อง Hot plate and magnetic stirrer (Heidolph รุ่น MR 3001, Germany)

14. Magnetic bar

15. เตาเผาไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ (muffle furnace) (Carbolite รุ่น ELF11/6B, Carbolite, England)

16. ตู้ดูดควัน (hood) (Toplab, Toblab Design & Technology, Thailand)

17. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa, Switzerland)

18. เครื่องปิดผนึกแบบใช้ความร้อน (A master, Num Charoen, Thailand)

19. เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Audion รุ่น Audionvac vm 203, Holland)

20. เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Shimadzu รุ่น Class-vp, Shimadzu Corporation, Japan)

21. เครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrometer (Varian รุ่น SpectrAA 220 FS, Varian Inc., USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Combustion (Leco รุ่น FP528, Leco Corporation, USA)

23. เครื่อง Rapid Visco Analyser (Newport Scientific, RVA-3D, Australia)

24. ตะแกรงร่อน (Test sieve) ขนาด 1.0 มิลลิเมตร (W.S. Tyler, ASTME:11, London)

25. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (JEOL, JSM-5410L V, Japan)

3.4 วิธีการศึกษา

แผนการทดลองประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 3.1) คือ การปรับปรุงเนื้อสัมผัสของข้าวกล้องโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟ การหาวิธีการผลิตข้าวหุงสุกเร็วที่เหมาะสม การศึกษาคุณภาพทางเคมีของข้าวกล้องดัดแปรเนื้อสัมผัสจากวิธีการใช้เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟและการหุงสุกเร็ว เปรียบเทียบกับข้าวกล้องปกติ และการศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และวิธีการบรรจุต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งรายละเอียดมีดังต่อไปนี้

3.4.1 การปรับปรุงเนื้อสัมผัสของข้าวกล้องโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟ

1) การเตรียมตัวอย่างข้าวเปลือกและข้าวกล้อง

เก็บตัวอย่างข้าวเปลือกข้าวหอมมะลิ 105 จากสถานีวิจัยเกษตร เขตชลประทาน จังหวัดเชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม 2551 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของข้าวเปลือกด้วยวิธี AOAC (2000) นำตัวอย่างข้าวเปลือกไปกะเทาะเปลือกออกด้วยเครื่องกะเทาะเปลือกขนาดทดลอง ได้เป็นข้าวกล้องเริ่มต้น เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนปิดสนิทและแช่เย็นทันทีเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเพสและป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชัน ผลิตข้าวกล้องใหม่สำหรับการทดลองแต่ละตอน

2) การย่อยเส้นใยข้าวกล้องด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำตัวอย่างของข้าวกล้อง (100 กรัม) ไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสภายในเวลาไม่เกิน 60 นาทีหลังการกะเทาะเปลือก ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 ระดับ (1.5, 3.5 และ 5.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในอัตราส่วนข้าว : สารละลายเอนไซม์ เท่ากับ 1:1.5 และระยะเวลาในการย่อย 3 ระดับ (1, 2 และ 3 นาที) (Hammond, 1994) โดยออกแบบการทดลองแบบ Factorial in Completely

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Randomized Design (Factorial in CRD) ขนาด 3×3 ทดลอง 3 ซ้ำ ใช้ข้าวกล้องเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการย่อยเส้นใยด้วยเอนไซม์เป็นตัวอย่างควบคุม

นำตัวอย่างข้าวกล้องที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไปสะเด็ดน้ำและซับให้แห้งด้วยกระดาษซับน้ำและนำไปผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟทันที โดยใช้กำลังไมโครเวฟที่ระดับ 850 วัตต์ เป็นเวลา 90 วินาที (พิไลรักและพรพิมล, 2553) ซึ่งจะไม่ทำให้ข้าวเกิดการไหม้หรือสูญเสียความชื้นมาก ปล่อยให้ข้าวกล้องเย็นแล้วบรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิท เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงระหว่างการรอวิเคราะห์ต่อไป ใช้ข้าวกล้องที่ไม่ผ่านการย่อยเส้นใยและให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นตัวอย่างควบคุม วิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างข้าวกล้อง ดังนี้

2.1) การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b โดยใช้เครื่อง Color Quest II Colorimeter (Chroma meter CR 300 Series, Japan)
- คุณภาพการหุง ได้แก่ length expansion ratio, volume expansion ratio, water uptake ratio และ optimum cooking time (Mohapatra and Bal, 2006) โดยควบคุมอัตราส่วนข้าว:น้ำ = 5 กรัม/100 มิลลิลิตร
- การเกิดเจลาติไนเซชันด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) (ศันสนีย์, 2548)
- เนื้อสัมผัสของข้าวกล้องหุงสุกด้วยเครื่อง Texture Analyzer โดยวิเคราะห์ Texture Profile Analysis (Gujral and Kumar, 2003) หุงข้าวกล้องโดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้าอัตโนมัติ
- การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (Zhou *et al*., 2002)
- ความหนืดและสมบัติการกระจายตัวของสตาร์ช ใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer (กล้าณรงค์และเกื้อกูล, 2550)

2.2) การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Zhao *et al*., 2007)
- กิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส (Prabhu *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3) การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

- ให้ผู้ทดสอบชิม ประเมินความชอบที่มีต่อคุณภาพของข้าวกล้องหุงสุกทางด้านสี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม โดยวิธี 9-point Hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบชิม 50 คน (ไพโรจน์, 2535) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD)

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (ไพโรจน์, 2535) เลือกข้าวกล้องจากสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณาจากคุณภาพการหุง เนื้อสัมผัส และคะแนนความชอบที่มีต่อคุณภาพของข้าวกล้องหุงสุกจากการประเมินโดยผู้ทดสอบชิม

3.4.2 การหาวิธีการผลิตข้าวหุงสุกเร็วที่เหมาะสม

1) วิธี soak – boil – dry

แช่ข้าวกล้องที่อุณหภูมิห้องให้มีความชื้นร้อยละ 30 ต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยให้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ 1:5 จนมีความชื้นร้อยละ 50 จากนั้นนำข้าวกล้องมาล้างน้ำเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทันที นำข้าวที่ได้ไปทำแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนข้าวมีความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 10 (พรทิพย์และคณะ, 2550) โดยศึกษา

- ระยะเวลาในการแช่ข้าวกล้องให้มีความชื้นร้อยละ 30
- ระยะเวลาในการต้มข้าวกล้องในน้ำเดือดให้มีความชื้นร้อยละ 50
- กราฟการลดความชื้น (moisture reduction curve) ของข้าวกล้องที่ต้มแล้ว และระยะเวลาในการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นสุดท้ายร้อยละ 10

2) วิธี dry heat treatment

ให้ความร้อนแห้งแก่ข้าวกล้องด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เมล็ดข้าวเปลี่ยนสภาพจากสตาร์ชเป็นเดกซ์ทริน (dextrinization), เกิดรอยร้าวและขยายตัว เป็นการช่วยลดระยะเวลาการหุงต้ม จากนั้นหุงข้าวในน้ำโดยให้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำเท่ากับ 1:5 จนมีความชื้นร้อยละ 50 แล้วทำให้เย็นด้วยการล้างน้ำเย็น 5 องศาเซลเซียส ทำแห้งด้วยเตาอบลมร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนข้าวมีความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 10 (พรทิพย์และคณะ, 2550) โดยศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ระยะเวลาในการหุงข้าวกล้องให้มีความชื้นร้อยละ 50

- กราฟการลดความชื้น (moisture reduction curve) ของข้าวกล้อง และระยะเวลาในการอบแห้งด้วยเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นสุดท้ายร้อยละ 10

เมื่อได้ข้าวกล้องหุงสุกเร็วทั้ง 2 วิธีแล้ว วิเคราะห์คุณภาพข้าวกล้อง ดังต่อไปนี้

2.1) การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- ค่าสี L, a และ b

- คุณภาพการหุง ได้แก่ length expansion ratio, volume expansion ratio, water uptake ratio และ optimum cooking time (Mohapatra and Bal, 2006) โดยควบคุมอัตราส่วนข้าว:น้ำ = 5 กรัม/100 มิลลิลิตร

- ความหนืดและสมบัติการกระจายตัวของสตาร์ช ใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer (กล้าณรงค์และเกื้อกูล, 2550)

- การวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (Zhou *et al*., 2002)

- การเกิดเจลาติไนเซชันด้วยวิธี Differential Scanning Calorimetry (DSC) (ศันสนีย์, 2548)

- เนื้อสัมผัสของข้าวกล้องหุงสุกด้วยเครื่องมือทดสอบ ใช้วิธี Texture Profile Analysis (Gujral and Kumar, 2003) หุงโดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้า

2.2) การวิเคราะห์ทางเคมี

- ปริมาณกรดไขมันอิสระ (Zhao *et al*., 2007)

เลือกวิธีการผลิตข้าวหุงสุกเร็วที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์ทางกายภาพและเคมีด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD)

2.3) การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

- การทดสอบชิม ทดสอบระดับความชอบที่มีต่อสี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม โดยวิธี 9-point hedonic scale test ใช้ผู้ทดสอบชิม 50 คน (ไพโรจน์, 2535) เพื่อหาวิธีการผลิตข้าวหุงสุกเร็วที่เหมาะสมจากการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 เปรียบเทียบวิธีการดัดแปรเนื้อสัมผัสและวิเคราะห์องค์ประกอบข้าวกล้อง

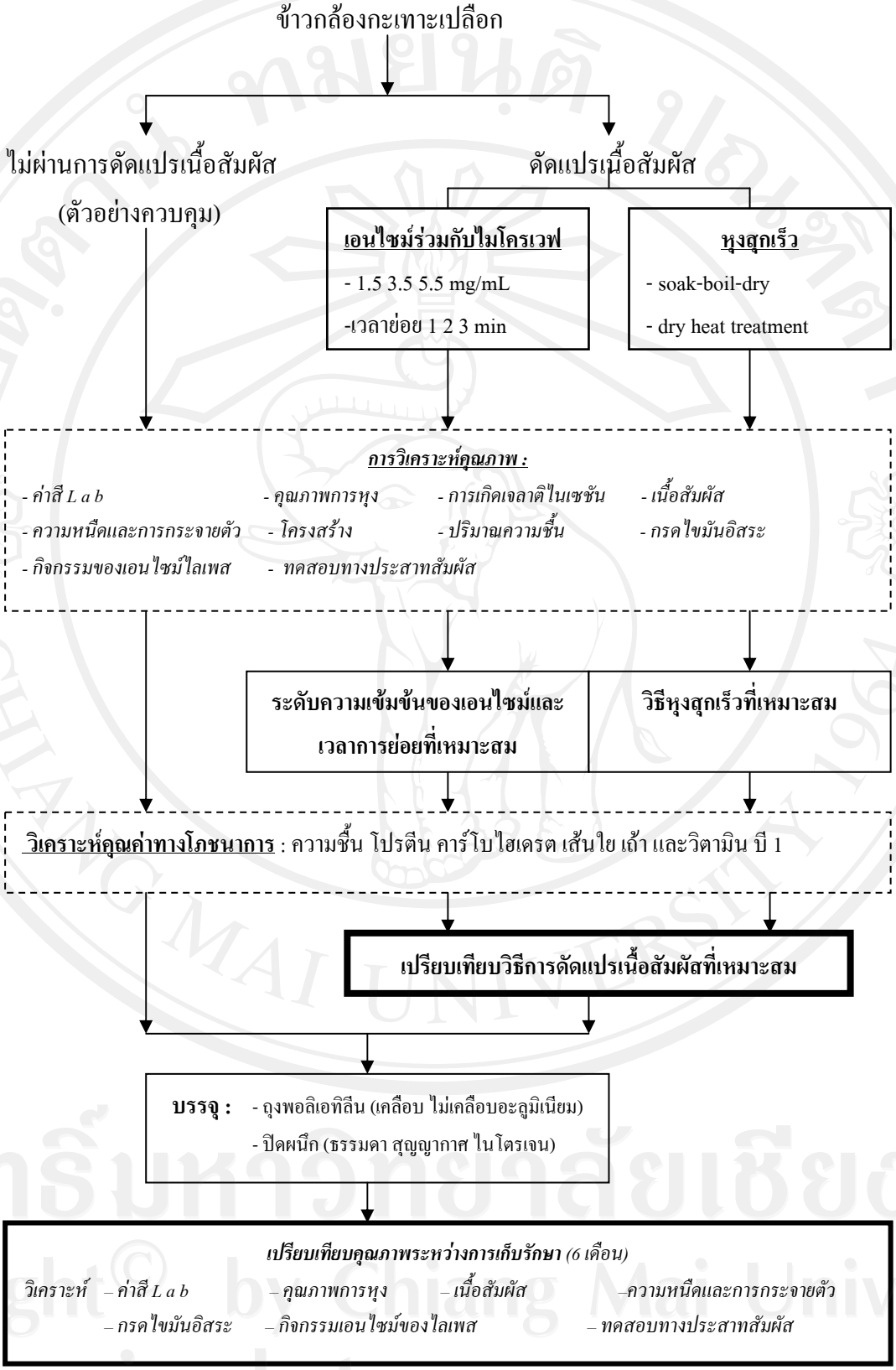
เปรียบเทียบสมบัติด้านต่าง ๆ ของข้าวกล้องดัดแปรเนื้อสัมผัสที่ผลิตโดยวิธีใช้เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟ และวิธีหุงสุกเร็ว และวิเคราะห์คุณภาพข้าวกล้องทั้งสามประเภทก่อนและหลังการหุง โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารด้วยวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานของ AOAC (2000) ดังนี้

- ความชื้น
- โปรตีน
- คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด
- เส้นใยอาหารทั้งหมด
- ไขมัน
- เถ้า
- วิตามินบี 1

3.4.4 การศึกษาผลของบรรจุภัณฑ์และวิธีการบรรจุต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของข้าวกล้องดัดแปรเนื้อสัมผัสระหว่างการเก็บรักษา

นำตัวอย่างข้าวกล้องดัดแปรเนื้อสัมผัสโดยใช้สภาวะการผลิตที่เหมาะสมที่สุดและข้าวกล้องปกติมาศึกษาอายุการเก็บรักษา โดยบรรจุข้าวกล้องในถุงพอลิเอทิลีนเคลือบและไม่เคลือบอะลูมิเนียม ถุงละ 200 กรัม ปิดผนึกแบบธรรมดา และแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 เดือน สุ่มตัวอย่างทุก 1 เดือน วิเคราะห์คุณภาพดังนี้ ค่าสี คุณภาพการหุง เนื้อสัมผัส ความหนืดและสมบัติการกระจายตัวของสตาร์ช กิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส และปริมาณกรดไขมันอิสระ เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสมบัติต่าง ๆ ของข้าวกล้องระหว่างการเก็บรักษา วางแผนการทดลองแบบ 2×3 Factorial in CRD ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.1 กระบวนการผลิตข้าวกล้องดัดแปรเนื้อสัมผัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved