

## บทที่ 3

### วิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุดิบ

ข้าวเปลือกพันธุ์ กข 6 จากโรงสีสหกรณ์สันป่าตอง อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ เก็บเกี่ยวในปี พ.ศ. 2555 และข้าวกล้องที่คอบดจากโรงสีบ้านนา อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ เก็บเกี่ยวใน พ.ศ. 2555

#### 3.2 สารเคมี และโคฟักเมนต์

##### สารเคมี

- Di-sodium hydrogenphosphate (QReC, Newzeland)
- Sodium dihydrogen phosphate (QReC, Newzeland)
- Leucine (Sigma-Aldrich, USA)
- Sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- 4-nitrophenyl laurate (Sigma-Aldrich, USA)
- Trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- Boric acid (Sigma-Aldrich, USA)
- Sulfuric Acid (J.T. Baker. Thailand)
- Copper sulphate (QReC, Newzeland)
- Sodium hydroxide (Labscan, Thailand)
- Sodium chloride (QReC, Newzeland)
- Sodium Carbonate (RFCL.India)

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)
- Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- Petroleum ether (Labscan, Thailand)
- Folin-Ciocalteu phenol (Merck, Germany)
- Methanol (Labscan, Thailand)
- Ethanol (Labscan, Thailand)
- Hydrochloric acid (Labscan, Thailand)
- Papain enzyme (Merck, Germany)
- Bromelain enzyme (Merck, Germany)
- Trypsin enzyme (Sigma-Aldrich, USA)
- Chymotrypsin enzyme (Sigma-Aldrich, USA)
- Flavorzyme<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, USA)
- Potassium Iodide (Merck, Germany)
- Acetic acid (Labscan, Thailand)
- Chloroform (Labscan, Thailand)
- Sodium Thiosulfate (QReC, Newzeland)
- Standard  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocochomanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Standard  $\gamma$ -oryzanol (Oryza Oil & chemical, Japan)
- Iso-propanal (Labscan, Thailand)
- DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, USA)
- Peptone water (Himedia, India)
- 3M petrifilm<sup>™</sup> Potato dextrose agar (3M, USA)
- 3M petrifilm<sup>™</sup> Plate count agar (3M, USA)
- Trinitrobenesulfonic acid dehydrate (TNBS) (Fluka, Japan)
- Sodium Carboxymethyl Cellulose (CMC) (Chongqing, China)

## โคพิกเมนต์

- สารสกัดชาเขียว (อีพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin; EGC) 13.11 มิลลิกรัม/กรัม, อีพิแกลโลคาเทชิน แกลเลท (Epigallocatechin gallate; EGCG) 40.61 มิลลิกรัม/กรัม, อีพิคาเทชิน แกลเลท (Epicatechin gallate; ECG) 78.39 มิลลิกรัม/กรัม, EC 166.23 มิลลิกรัม/กรัม, GC 16.15 มิลลิกรัม/กรัม, คาเทชิน (Catechin; C) 88.10 มิลลิกรัม/กรัม และความชื้นร้อยละ 5.12)

- กรดแกลลิก (QReC, Newzeland)

- กรดแอสคอร์บิก (QReC, Newzeland)

### 3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม (Precisa, Switzerland)

- ตู้ดูดควัน (Toplab, Toblab Design & Technology, Thailand)

- เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Heidolph รุ่น MR 3001, Germany)

- ตู้อบความร้อนแบบไฟฟ้า (Memmert รุ่น ULM500, Germany)

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hermle, Germany)

- โถดูดความชื้น (Duran, China)

- เตาเผาไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิได้ (Carbolite รุ่น ELF11/6B, Carbolite, England)

- เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Leco รุ่น FP528, USA)

- เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu รุ่น Class-vp, Shimadzu Corporation, Japan)

- เครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (Agilent รุ่น 1100, Agilent Thecnology, USA)

- ตู้อบความร้อนแบบสุญญากาศ (Termaks, Norway)

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model, Genesys 10 UV scanning, USA)

- เครื่องวัดค่าพีเอช (Jenco รุ่น 6071, China)

- เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec Extractor Model 2050, Denmark)

- เครื่องวัดสี (CR-300Minolta, Japan)

- เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Memmert, Germany)

- อ่างน้ำร้อน (Memmert, Germany)
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator, Buchi Vacobox B177, Switzerland)
- เครื่องวัดความหนืด (DV-II+ Pro Viscometer, USA)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze zone 45 Labconco, USA)

### 3.4 การทดลอง

#### 3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

กะเทาะเปลือกข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ด้วยเครื่องกะเทาะ นำไปขัดขาวด้วยเครื่องขัดขาวแบบ McGill จากนั้นนำข้าวร้อนผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh เก็บตัวอย่างข้าวที่ผ่านการร่อนกำจัดเศษข้าวหักและสิ่งแปลกปลอมแล้วใส่ในถุงโพลีเอทิลีน (Polyethylene, PE) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แบ่งตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการทางเคมี ได้แก่

- ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)
- ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)
- ปริมาณไขมัน โดยเครื่อง Soxtec Extractor รุ่น 2050
- ปริมาณเส้นใย (AOAC, 2000)
- ปริมาณโปรตีน โดยเครื่อง High Temperature Combustion ยี่ห้อ LECO รุ่น FP-528

จากนั้นนำข้าวที่เก็บไว้มาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008) วิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วย วิธี DPPH radical scavenging activity (Laokuldilok *et al.*, 2011) วิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน (ดัดแปลงจากวิธีของ Hosseinian *et al.*, 2007), วิเคราะห์แกมมาออริซานอล โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent 1100, USA) (ดัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012), วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และวิตามินบี 6 โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent 1100, USA) (ดัดแปลงจากวิธีของ Lebidzin'ska และ Szefer, 2006) และวิเคราะห์โทโคฟีรอล และโทโคไตรอีนอล โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu, Japan) (ดัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012)

### 3.4.2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในรำข้าวโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส

แบ่งตัวอย่างที่ผ่านการร่อนตะแกรงขนาด 20 mesh ไปผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนทางการค้าชนิดต่างๆ ได้แก่ ปาเปน (Merk, Germany) โบรมิเลน (Merk, Germany) ทริปซิน (Sigma-Aldrich, USA) ไคโมทริปซิน (Sigma-Aldrich, USA) และฟลาโวไซม์ (Sigma-Aldrich, USA) ตามสภาวะดังตาราง 3.1 โดยใช้ 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 4.0 และ 8.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในอัตราส่วนรำข้าวต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 (น้ำหนัก : ปริมาตร) ติดตามผลทุกๆ 15 นาที นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1.0 นอร์มอล ไฮโดรคลอริกจนได้พีเอช เท่ากับ 3.0 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนที่เป็นของแข็ง (A) และส่วนที่เป็นสารละลาย (B) นำส่วนที่เป็นของแข็งล้างด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นเหวี่ยงทำทั้งหมด 3 ชั่วโมง นำส่วนที่เป็นของแข็งไปทำการอบด้วยเครื่องอบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เก็บ (A) และ (B) ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ติดตามกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipase activity) (Hoshino *et al.*, 1992) ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) (Adler-Nissen *et al.*, 1986) และความสามารถในการละลายของโปรตีน (Protein solubility) (Lowry *et al.*, 1951) และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 3.1 สภาวะที่ใช้ในการย่อยโปรตีนจากรำข้าวโดยใช้เอนไซม์

ชนิดของเอนไซม์	พีเอช	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แอกติวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)
โบรมิเลน	6.0	35.5	2.6
ปาเปน	6.0	40	30350.0
ทริปซิน	7.8	25	14400.0
ไคโมทริปซิน	7.6	25	65.6
ฟลาโวไซม์	7.6	25	500

### 3.4.3 ศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการคงสภาพรำข้าวที่มีผลต่อปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญและวิตามินบีในรำข้าว

การคงสภาพรำข้าวด้วยเอนไซม์จะพิจารณาจากเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะพิจารณาจากการทดลองในข้อ 3.4.2 เลือกเอนไซม์โปรติเอสที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งไลเปสได้สมบูรณ์ และให้ค่าระดับการย่อย และค่าการละลายของโปรตีนสูงสุด และพิจารณาความคุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ประกอบด้วย โดยเปรียบเทียบกับ การคงสภาพรำข้าวด้วยความร้อน โดยนำรำข้าวทั้งสองพันธุ์ไปนึ่งโดยวางรำข้าว 200 กรัม แผ่กระจายบนผ้าขาวทำการนึ่งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลงจาก Poovarodom *et al.*, 1982) จากนั้นอบให้แห้ง ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากนั้นนำรำข้าวพันธุ์ กข 6 และรำข้าวพันธุ์ก้าคดยสะเกิดที่ ผ่านการคงสภาพด้วยความร้อน และผ่านการคงสภาพด้วยเอนไซม์ มาศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์คงเหลือหลังการคงสภาพเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ไม่ผ่านการคงสภาพ ดังนี้

3.4.3.1 ปริมาณวิตามินอี (Shimadzu, Japan) (ดัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012)

3.4.3.2 ปริมาณแกมมา-ออริซานอล (Agilent 1100, USA) (ดัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012)

3.4.3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008)

3.4.3.4 ปริมาณแอนโทไซยานิน (ดัดแปลงจากวิธีของ Hosseinian *et al.*, 2007)

3.4.3.5 กิจกรรมการต้านออกซิเดชั่น (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Laokuldilok *et al.*, 2011)

3.4.3.6 วิตามินบี 1 บี 2 และ บี 6 (Agilent 1100, USA) (ดัดแปลงจากวิธีของ Lebedzin ska และ Szefer, 2006)

### 3.5 ศึกษาเสถียรภาพของรำข้าวที่ผ่านการคงสภาพระหว่างการเก็บรักษา

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 6 สิ่งทดลอง ได้แก่ (1) รำข้าวดิบพันธุ์ กข6 (RN) (2) รำข้าวดิบพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด (DN) (3) รำข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ผ่านการคงสภาพด้วยเอนไซม์โปรติเอส (RE) (4) รำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด ที่ผ่านการคงสภาพด้วยเอนไซม์โปรติเอส (DE) (5) รำข้าวพันธุ์ กข 6 ที่ผ่านการคงสภาพด้วยความร้อน (RH) (6) รำข้าวพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด ที่ผ่านการคงสภาพด้วยความร้อน (DH) บรรจุในถุงโพลีเอทิลีนแบบ Zip-lock เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำการวิเคราะห์ทางกายภาพและทางเคมี ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน ทำการวิเคราะห์ดังนี้

3.5.1 ปริมาณวิตามินอี (Shimadzu, Japan) (ตัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012)

3.5.2 ปริมาณแกมมา-ออริซานอล (Agilent 1100, USA) (ตัดแปลงจากวิธีของ Chalermpong *et al.*, 2012)

3.5.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008)

3.5.4 ปริมาณแอนโทไซยานิน (ตัดแปลงจากวิธีการของ Hosseinian *et al.*, 2007)

3.5.5 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging) (ตัดแปลงจากวิธีการของ Laokuldilok *et al.*, 2011)

3.5.6 ค่าเปอร์ออกไซด์ (AOAC, 2000)

3.5.7 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Hoshino *et al.*, 1992)

3.5.8 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (AOAC, 2000)

### 3.6 ศึกษาแนวทางการใช้ประโยชน์จากรำข้าวที่ผ่านการคงสภาพเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง

ใช้รำข้าวที่ผ่านการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปรับปรุงลักษณะทางกายภาพโดยเอนไซม์โปรติเอสเป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง

### 3.6.1 การพัฒนาสูตรเครื่องดื่มแอนโทไซยานินสูง

สำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอนโทไซยานินสูงนั้นมีเป้าหมายในการพัฒนาสูตรเพื่อให้เครื่องดื่มนี้มีความเข้มข้นของสารแอนโทไซยานินไม่ต่ำกว่าในไวน์แดง โดยจากการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในไวน์แดง 8 ตัวอย่าง พบว่ามีความเข้มข้นแอนโทไซยานินเฉลี่ย 85 มิลลิกรัม/ลิตร (Sanchez-Moreno *et al.*, 2010) การพัฒนาสูตรจะเริ่มจากการสำรวจผู้บริโภค 400 คน นำผลที่ได้มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ จากนั้นอาศัยเทคนิควิธีทดสอบสเกลพอดี (Just about right) ในปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ต้นแบบ และทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วย 9 point hedonic scale ขั้นตอนต่อมาจะทดสอบและเปรียบเทียบสูตรเครื่องดื่มที่ได้ผ่านการปรับปรุงด้วยเทคนิค Just about right โดยคัดเลือกสูตรที่ได้รับคะแนนยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงสุดมาวิเคราะห์คุณลักษณะด้านต่างๆ ดังนี้

3.6.1.1 ปริมาณแอนโทไซยานิน (ดัดแปลงวิธีการของ Hosseini *et al.*, 2007)

3.6.1.2 วัดค่าสี ด้วยระบบ C.I.E. Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) (AOAC, 2000)

3.6.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (AOAC, 2000)

3.6.1.4 ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.1.5 ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.1.6 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008)

3.6.1.7 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีของ Laokuldilok *et al.*, 2011)

### 3.6.2 ศึกษาผลของการทำโคพิกเมนต์ต่อการคงตัวของแอนโทไซยานินระหว่างกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ชนิดของโคพิกเมนต์ 3 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากชาเขียว กรดแกลลิก และกรดแอสคอร์บิกโดยแปรอัตราส่วนโดยโมลของแอนโทไซยานิน : โคพิกเมนต์ 5 ระดับ ดังนี้ 1:0.10, 1:0.25, 1:0.5, 1:0.75 และ 1:1 เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการโคพิกเมนต์ (ตัวอย่างควบคุม) นำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรเซชัน ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส



นาน 15 นาที ออกแบบการทดลองแบบ 3x5 Factorial in CRD วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพ และปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในเครื่องดื่มที่ได้ ดังนี้

3.6.2.1 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีการของ Hosseinian *et al.*, 2008)

3.6.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008)

3.6.2.3 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีของ Laokuldilok *et al.*, 2011)

3.6.2.4 วัดค่าสี ด้วยระบบ C.I.E. Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) และคำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E$ ) (AOAC, 2000)

3.6.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (AOAC, 2000)

3.6.2.6 ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.2.7 ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.2.8 ทดสอบทางประสาทสัมผัส (9 points hedonic scaling test)

### 3.6.3 การศึกษาเสถียรภาพของแอนโทไซยานินในเครื่องดื่มระหว่างการเก็บรักษา

นำเครื่องดื่มที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานินคงเหลือหลังการฆ่าเชื้อสูงสุดมาบรรจุในขวดแก้วใสและขวดแก้วสีชา ทำการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ นาน 15 วัน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อจำลองสภาวะที่จะขายจริง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการทำโคพิกเมนต์ทำวิเคราะห์ค่าต่างๆ ในระหว่างเก็บรักษาทุก 3 วัน ดังนี้

3.6.3.1 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีการของ Hosseinian *et al.*, 2008)

3.6.3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Anesini *et al.*, 2008)

3.6.3.3 กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (DPPH radical scavenging) (ดัดแปลงจากวิธีของ Laokuldilok *et al.*, 2011)

3.6.3.4 วัดค่าสี ด้วยระบบ C.I.E. Lab ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) และคำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E$ ) (AOAC, 2000)

3.6.3.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (AOAC, 2000)

3.6.3.6 ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.3.7 ปริมาณของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.3.8 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2000)

3.6.3.9 ปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2000)

#### 3.6.4 การทดสอบผลิตภัณฑ์สุดท้าย

การทดสอบด้านต่างๆ ได้แก่ ทางเคมี ทางจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 2000) ปริมาณยีสต์และรา (AOAC, 2000) และ ปริมาณโคลิฟอร์ม (AOAC, 2000) ทางประสาทสัมผัส โดยจะทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค จำนวน 50 คน (9 points hedonic scaling test)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved