บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา เป็นข้าวพื้นเมืองมีสีที่พบในภาคใต้ ได้แก่ กลุ่มข้าวเจ้าจำนวน 3 พันธุ์ และกลุ่มข้าวเหนียว 5 พันธุ์ ซึ่งเก็บเกี่ยวในเดือนเมษายน 2550 ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ชื่อพันธุ์ข้าวและหน่วยงานที่อนุเคราะห์

ชื่อพันธุ์ข้าว	ชื่อย่อ	ชนิด	หน่วยงานที่อนุเคราะห์
สังข์หยด	SY	ข้าวเจ้า	ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
กำหยาน	KN		ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
หอมกระดังงา	HK		สำนักงานเกษตรอำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส
กรามแรด	KR	ข้าวเหนียว	ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
ช่อไม้ไผ่	CMP		ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
เหนียวดำ รหัส PTNC 96025	BWR-96025		ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
เหนียวดำ รหัส PTNC 96044	BWR-96044		ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี
เหนียวแดง รหัส PTNC 96060	RWR-96060		ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดปัตตานี

3.1.2 สารเคมี

ก. สารเคมีในกลุ่มกรด

- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl), กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), กรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3), กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH) และกรดฟอมิก (Formic acid, CH_2O_2) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

ข. สารเคมีในกลุ่มด่าง

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ค. สารเคมีในกลุ่มอินดิเคเตอร์

- เมทิลเรด (Methylred, $C_{15}H_{15}N_3O_2$), เมทิลีนบลู (Methylenblue, $C_{16}H_{18}N_3$ ClS), และโบรโมคลีซอลกรีน (Bromocresolgreen, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) (Merck, ประเทศเยอรมัน)

ง. สารเคมีในกลุ่มตัวทำละลาย

- ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) และเอทานอล (Ethanol, C_2H_6O) Analytical grade และเมทานอล (Methanol, CH_3OH) HPLC grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

จ. สารเคมีในกลุ่มอื่นๆ

- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl), คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, $CuSO_4$), โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4), โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide, KI), ไอโอดีน (Iodine), โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide, KOH) Analytical grade (Labscan Asia co, Ltd., ประเทศไทย)

- อะไมโลสบริสุทธิ์จากมันฝรั่ง (Pure potato amylose), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) กรดแกลลิก (Gallic acid, $C_7H_6O_5$) และสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, $C_{14}H_{18}O_4$) (Fluka, ประเทศอังกฤษ)

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์และอุปกรณ์

ก. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

- เครื่องกะเทาะเปลือกข้าว (บริษัททองทวี, ประเทศไทย)
- เครื่องขัดสี (บริษัทเง็กเซ่งฮวด, ประเทศไทย)
- เครื่องโม่ (Model Cyclotec™ 1093, Foss, Sweden)
- เครื่องปั่น (Model Perfect blender, Moulinex, Mexico)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model SevenEasy, Mettler Toledo, Switzerland)
- ตะแกรงร่อน ขนาด 60 และ 80 เมช (Model AS200 digit, RETSCH®, Germany)
- ตู้อบแบบลมร้อน (Hot air oven) (Model UNB 500, Memert, German)
- อ่างน้ำร้อน (Water bath) (Model WB-22, Memert, German)
- Roller mixer (Model RM-500, DS LAB ROLLER MIXER, Taiwan)
- Muffle furnace (Model Isotemp® muffle furnace, Fisher Scientific, USA)
- เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) (Model R-210, Buchi, Switzerland)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) (Model HARRIER 15/80 Bench Top Refrigerated Centrifuge, Sanyo, Japan)
- หม้อหุงข้าวไฟฟ้า (Model SR-G06, Panasonic, Thailand)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Model TE 313S-DS 310, Sartorius, USA)
- เครื่องผสม (Vortex mixer) (Model Vortex Genic 2, Scientific industries, USA)
- เครื่องแก้ว เช่น ไปเปต บีกเกอร์ กระบอกตวง

ข. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องย่อยและกลั่นโปรตีน (Model VAP20, Gerhardt, Germany)
- เครื่องสกัดใยอาหาร (Model RF 16/6, Gerhardt, Germany)
- เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) (Model TA-XT2i, Stable micro system, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Libra S22, Biochrom, England)
- เครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Viscosity Analyzer) (Model Super-4, Newport Scientific, Australia)
- Differential Scanning Calorimeter (Model Diamond DSC, PerkinElmer, German)
- เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Laser Particle Size Analyzer) (Model LS230, Coulter, USA)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) (Model JSM-5800LV, Jeol, Japan)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Model CH30, Olympus, Japan)
- High Performance Liquid Chromatography (Model 1200 Series, Agilent, USA)
- Atomic Absorption Spectrophotometer (Model 100 Analyzer, Perkin Elmer, Germany).
- เครื่องวัดสี (Hunter Lab) (Model CQ/UNI-1600, Hunter Lab, USA)
- เครื่องสกัดไขมัน (Model S-306 MK, Gerhardt, German)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างข้าวทุกพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัย จะมีการเตรียมให้อยู่ในรูปของ ข้าวกล้อง ข้าวขัดขาว แป้งข้าว และสตาร์ชข้าว ตามวิธีดังนี้

3.3.1.1 ข้าวกล้อง โดยการกะเทาะเปลือกของข้าวเปลือกด้วยเครื่องกะเทาะเปลือกข้าว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นข้าวกล้อง จากนั้นนำข้าวกล้องที่ได้ไปบรรจุในถุงพลาสติกปิดผนึกให้เรียบร้อยแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.1.2 ข้าวขัดขาว เตรียมจากข้าวกล้องที่ได้จาก 3.3.1.1 นำไปผ่านการขัดสีโดยเครื่องขัดข้าว เพื่อกำจัดเยื่อหุ้มเมล็ดออกไป บรรจุข้าวขาวในถุงพลาสติก และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสคำนวณระดับการขัดสีดังนี้

ระดับการขัดสี (อรอนงค์, 2547)

$$\text{น้ำหนักรำที่หายไป (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \times 100$$

โดย m_1 คือน้ำหนักข้าวกล้อง

m_2 คือน้ำหนักข้าวสาร

การแปลผลค่าที่คำนวณได้เพื่อหาระดับของการขัดสี สามารถแบ่งระดับการสีออกเป็น 4 ระดับ ตามวิธีการของ อรอนงค์ (2547)

สีดีพิเศษ หมายถึง น้ำหนักรำที่หายไป 8 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า

สีดี หมายถึง น้ำหนักรำที่หายไป 7-7.9 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า

สีดีปานกลาง หมายถึง น้ำหนักรำที่หายไป 6-6.9 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า

สีธรรมดา หมายถึง น้ำหนักรำที่หายไป 5-5.9 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า

3.3.1.3 แป้งข้าว (Flour) ในการวิจัยครั้งนี้มีการใช้แป้งข้าวในรูปของของแป้งข้าวกล้องและแป้งข้าวที่ผ่านการขัดขาว เตรียมโดยการบดแห้งด้วยเครื่องบด แล้วร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 และ 80 เมช

3.3.1.4 สตาร์ช (Starch) เตรียมตามวิธีการของ Juliano (1985) นำข้าวไปบดแห้ง จากนั้นนำแป้งข้าวไปกำจัดโปรตีนที่ละลายได้ในเกลือ แอลกอฮอล์ และเบส ตามลำดับ โดยใช้สารเคมีได้แก่ สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.35 เปอร์เซ็นต์

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.2 ศึกษาสมบัติของข้าว

ศึกษาสมบัติของเมล็ดข้าว คือ สมบัติทางกายภาพของเมล็ดข้าว สมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้

3.3.2.1 สมบัติทางกายภาพของเมล็ดข้าว

กำหนดจากคุณลักษณะของเมล็ดข้าวที่มองเห็น สามารถ ชั่ง ตวง วัดได้ โดยจะทำการวิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างข้าวเปลือก ข้าวกล้อง และข้าวขัดขาวดังต่อไปนี้

3.3.2.1.1 น้ำหนักเมล็ด โดยการชั่งน้ำหนักตัวอย่างข้าวด้วยจำนวนเมล็ดคงที่ คือ น้ำหนักเป็นกรัม/100 เมล็ด (อรอนงค์, 2547)

3.3.2.1.2 สีของเมล็ดข้าวด้วยเครื่อง Hunter Lab (Lamberts *et al*., 2007)

3.3.2.1.3 ขนาดของเมล็ดข้าว โดยทำการคัดเลือกเอาเมล็ดสมบูรณ์ วัดความยาว ความกว้าง และความหนาโดยใช้เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์เป็นเครื่องมือในการวัด

3.3.2.1.4 วิเคราะห์รูปร่างเมล็ดข้าว จากอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง โดยเทียบรูปร่างของเมล็ดข้าวตามตารางที่ 2 ในบทที่ 2 (อรอนงค์, 2547)

3.3.2.2 สมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการ

โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและ คุณค่าทางโภชนาการ ในตัวอย่างข้าวกล้อง ข้าวขัดขาว และสตาร์ช ซึ่งแสดงวิธีการวิเคราะห์ดังภาคผนวก ก ดังต่อไปนี้

3.3.2.2.1 ปริมาณธาตุเหล็ก (Bindra *et al*., 1986)

3.3.2.2.2 ปริมาณวิตามินบีหนึ่งและอี โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Sancho *et al*. (1998)

3.3.2.2.3 ปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น ใยอาหารและปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 2000)

3.3.2.2.4 ปริมาณอะไมโลสในสตาร์ช (ISO, 1987)

3.3.2.2.5 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยการสกัดด้วยเมทานอล น้ำ และกรดฟอร์มิก (Aguitar-Garcia, 2007)

3.3.2.2.6 การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วย DPPH ดัดแปลงจาก Zigonenu *et al*. (2007)

3.3.2.2.7 การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วย ABTS ดัดแปลงจาก Choi *et al*. (2007)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.3 ศึกษาสมบัติของสตาร์ชข้าว

3.3.3.1 สมบัติทางโครงสร้าง

3.3.3.1.1 รูปแบบโครงสร้างผลึกของเม็ดสตาร์ชด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ตามวิธีการของ Wajira and David (2007)

3.3.3.1.2 รูปร่างและลักษณะของเม็ดสตาร์ชโดยการใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ตามวิธีการของ Navdeep and Narpinder (2003)

3.3.3.1.3 ลักษณะมอลตีสครอส (Maltese cross) ของเม็ดสตาร์ช ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบมีแสงโพลาไรซ์ (กล้าณรงค์และเกื้อกูล, 2546)

3.3.3.1.4 การกระจายตัวและขนาดของเม็ดสตาร์ชด้วย Particle Size Analyzer โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ตามวิธีการของ Kaur *et al*. (2004)

3.3.3.1.5 ความหนืดอินทรินสิค (Intrinsic viscosity) ด้วยคาปิลลารี่วิสโคมิเตอร์ (Tanglertpaibul and Rao, 1987)

3.3.3.2 สมบัติเชิงหน้าที่

3.3.3.2.1 กำลังในการพองตัว และการละลาย (Li and Yeh, 2001)

3.3.3.2.2 ความหนืดของสตาร์ช และการเปลี่ยนแปลงความหนืด ด้วยเครื่อง Rapid Viscosity Analyzer (RVA) (Newport Scientific, 1998)

3.3.3.2.3 อุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชันด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (Kaur *et al*., 2004)

3.3.3.2.4 รีโทรกราเดชันด้วยเครื่อง DSC (Kaur *et al*., 2004)

3.3.3.2.5 ความคงทนต่อการแช่แข็งและการละลาย (Freeze-thaw stability) (Waliszewski *et al*., 2003)

3.3.3.2.6 เนื้อสัมผัสของเจลด้วยเครื่อง Texture Analyzer (Cheng *et al*., 2005)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.4 การศึกษาคุณภาพในการหุงต้ม

ศึกษาคุณภาพการหุงต้มของข้าวกล้องและข้าวขัดขาว คือสมบัติของการยืดตัวของเมล็ดข้าว และการขยายปริมาตรของเมล็ดข้าว ตามวิธีการต่อไปนี้

3.3.4.1 เตรียมตัวอย่างข้าว (กรมการข้าว, 2550)

- การหุงข้าวเจ้าใช้อัตราส่วนข้าวต่อน้ำ คือ 2:1.5 นำหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่างลงไปแช่ในน้ำเดือด ใช้เวลาหุงประมาณ 20 นาที
- การนึ่งข้าวเหนียวโดยแช่ข้าวเหนียวในน้ำนาน 1 คืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วเอาข้าวพักไว้ให้สะเด็ดน้ำ 10 นาที นำข้าวใส่หลอดทดลองจากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยการนึ่งด้วยไอน้ำ นาน 20 นาที

3.3.4.2 การยืดตัวของเมล็ดข้าว โดยวัดความยาวข้าวสุกที่ผ่านการเตรียมมาแล้วจากข้อ 10.3.1 จำนวน 10 เมล็ด แล้วคำนวณหาอัตราการยืดตัว ตามวิธีการของอรอนงค์ (2547) ตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการยืดตัวของข้าวสุก} = \frac{L_2}{L_1}$$

โดย L_2 คือความยาวเฉลี่ยของเมล็ดข้าวสุก

L_1 คือความยาวเฉลี่ยของเมล็ดข้าวสาร

3.3.4.3 การขยายปริมาตร โดยวัดความสูงของข้าวในหลอดทดลองก่อนหุงและหลังหุง จำนวน 3 ซ้ำ และคำนวณตามวิธีการของ อรอนงค์ (2547)

$$\text{อัตราการขยายปริมาตร} = \frac{M_2}{M_1}$$

โดย M_2 คือความสูงเฉลี่ย (ปริมาตรเฉลี่ย) ข้าวสุก

M_1 คือความสูงเฉลี่ย (ปริมาตรเฉลี่ย) ข้าวสาร

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.5 การศึกษาคุณภาพในการรับประทาน

3.3.5.1 เตรียมตัวอย่างข้าว ดัดแปลงจาก กรมการข้าว (2550)

- ข้าวเจ้าใช้วิธีการหุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า อัตราส่วนข้าวต่อน้ำ 1:1.5 ใช้เวลาหุงประมาณ 30 นาที
- ข้าวเหนียวใช้วิธีการนึ่งโดยนำข้าวเหนียวมาแช่น้ำนาน 1 คืน เอาข้าวพักไว้ให้สะเด็ดน้ำ 10 นาทีจากนั้นนำไปนึ่งด้วยลังถึงเป็นระยะเวลา 20 นาที

3.3.5.2 ศึกษาลักษณะเนื้อสัมผัส (ความแข็งและความเกาะติด) ของข้าวกล้อง และข้าวขัดด้วย Texture Analyzer ตามวิธีการของ Singh *et al*. (2003)

3.3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติของคุณภาพในการขัดสี สมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี สมบัติทางโครงสร้าง สมบัติเชิงหน้าที่ คุณภาพในการหุงต้ม การแปรรูป และรับประทาน วางแบบแผนในการทดลองแบบ Complete randomize design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ดังตารางที่ 16 จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ด้วยวิธี Pearson Correlation ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเลือกสมบัติที่มีความสัมพันธ์กันและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 0.8 เพื่อหาสมการความสัมพันธ์ต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 16 แสดงแผนการทดลองและวิธีการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิธีการศึกษา	จำนวนซ้ำ	แบบแผนการทดลอง	วิเคราะห์ความแปรปรวน	วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ย
ระดับการขัดสี	10	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
สมบัติทางกายภาพของเมล็ดข้าว				
• น้ำหนักและขนาดของเมล็ดข้าว	10	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• สีของเมล็ดข้าว	15	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
องค์ประกอบและสมบัติทางเคมี				
• เหล็ก	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• ปริมาณโปรตีน ไขมัน ใยอาหาร ความชื้น เถ้า	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• ปริมาณอะไมโลส				
• ปริมาณสารโพลีฟีนอล	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• การยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ และ $ABTS^{\cdot+}$	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
สมบัติทางโครงสร้าง				
• ความหนืดอินทรินสิค	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
สมบัติเชิงหน้าที่				
• กำลังการพองตัวและการละลาย	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• การเปลี่ยนแปลงความหนืดด้วย RVA	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 16 แสดงแผนการทดลองและวิธีการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ (ต่อ)

วิธีการศึกษา	จำนวนซ้ำ	แบบแผนการทดลอง	วิเคราะห์ความแปรปรวน	วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ย
• อุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนเซชัน	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• อุณหภูมิในการเกิดรีโทรกราเดชัน	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็ง	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• เนื้อสัมผัสของเจล	5	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
คุณภาพในการหุงต้ม				
• การยืดตัวของเมล็ด	10	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
• การขยายปริมาตร	3	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test
คุณภาพในการรับประทาน				
• เนื้อสัมผัสของข้าว	5	CRD	ANOVA	Duncan's multiple range test

Prince of Songkla University Pattani Campus