

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. ข้าวกล้อง

ตัวอย่างข้าวกล้องที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าวกล้องหอมมะลิแดง พันธุ์หอมมะลิ 105 หรือเป็นที่รู้จักและเรียกกันโดยทั่วไปในชื่อ ข้าวกล้องมันปูหรือข้าวหอมแดง ซึ่งตัวอย่างข้าวนี้จะผ่านการขัดสีเพียงครั้งเดียว จากบ้านวังแดง ตำบลเขาทราย อำเภอทับคล้อ จังหวัดพิษณุโลก เพื่อเป็นกะเทาะเอาเปลือกนอก (แกลบ) ออกเท่านั้น และในระหว่างดำเนินการทดลอง จะเก็บตัวอย่างข้าวกล้องมันปูไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิและความชื้นต่ำ มีภาชนะปิดมิดชิด เพื่อช่วยลดและชะลอความเสียหายอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเมล็ดข้าว และหลีกเลี่ยงการรบกวนจากสัตว์แมลงที่ไม่พึงประสงค์ เพื่อรอการวิเคราะห์ในส่วนต่อไป

2. ข้าวเปลือก

ตัวอย่างข้าวเปลือกที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าวเปลือกหอมมะลิแดง พันธุ์หอมมะลิ 105 จากบ้านวังแดง ตำบลเขาทราย อำเภอทับคล้อ จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งในระหว่างรอการวิเคราะห์และดำเนินการทดลอง จะมีวิธีการเก็บรักษาเช่นเดียวกับข้าวกล้องหอมมะลิแดงดังกล่าวไว้ข้างต้น

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (Shimadzu, Class VP)
2. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Buchi, B435)
3. เครื่องวิเคราะห์ไขมันและน้ำมัน (Buchi, B-810)
4. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (Velp, Fine 6)
5. เครื่องวิเคราะห์เถ้า (Fisher, 10-650-126)
6. เครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน (Buchi Rotavapor, R-114)
7. เครื่องวัด pH Meter (Sartorius, PB-20)
8. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AC 2105)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Poly Science, 8205)
10. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, Model 5300)

11. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray Dryer, KPO-700)
12. Magnetic Stirrer (Boeco, MSH 300)
13. ชุดอุปกรณ์การไตเตรท
14. ชุดอุปกรณ์การกรอง
15. แผ่นให้ความร้อน
16. เครื่องปั่นผสม
17. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น บีกเกอร์, ขวดแก้วรูปชมพู่, ขวดปรับปริมาตร, หลอดทดลอง, แท่งแก้วขนสาร, กระจกตวง, เทอร์โมมิเตอร์, กระจกกรอง และอื่น ๆ

สารเคมี

1. Standard Solution of GABA (Sigma, Germany)
2. Ethanol (Merck, Germany)
3. Triethylamine (Ajax, New Zealand)
4. Phenylisothiocyanate (Fluka, Japan)
5. Sodium Acetate (Merck, Germany)
6. Acetic Acid (Merck, Germany)
7. Petroleum Ether (Lab-scan, Ireland)
8. Acetonitrile HPLC Grade (Lab-scan, Ireland)
9. Methanol HPLC Grade (Lab-scan, Ireland)
10. Water HPLC Grade (Merck, Germany)
11. Distill Water

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงผลของการรอกต่อปริมาณแกมมา-อะมิโนบิวทริก แอซิดในข้าวเปลือก และข้าวกล้องมันปู (โดยการเปรียบเทียบกับข้าวมันปูที่เป็นตัวอย่างควบคุม ซึ่งไม่ได้ผ่านการรอก) เพื่อหาสภาวะการรอกที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาถึงผลของกระบวนการผลิตต่อปริมาณแกมมา-อะมิโนบิวทริก แอซิด ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งใช้ข้าวกล้องมันปูรอกเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหาร โดยมีขั้นตอนในการศึกษาวิจัยดังนี้

ตอนที่ 1 การเตรียมข้าวออก

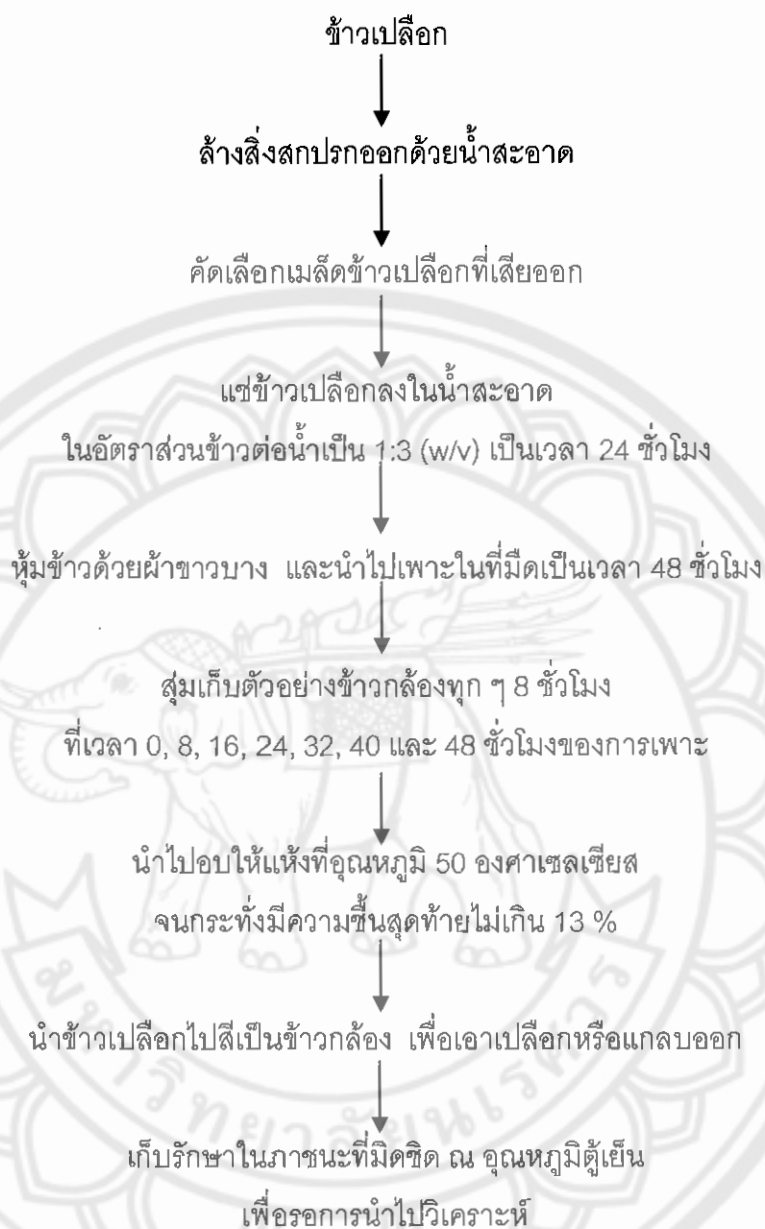
ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการทดลองทำข้าวออก คือ ข้าวมันญี่ปุ่นพันธุ์หอมมะลิ 105 โดยตัวอย่างข้าวมันญี่ปุ่นที่นำมาทำข้าวออกในขั้นตอนนี้มี 2 กลุ่มตัวอย่าง คือ ข้าวเปลือก และข้าวกล้อง

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

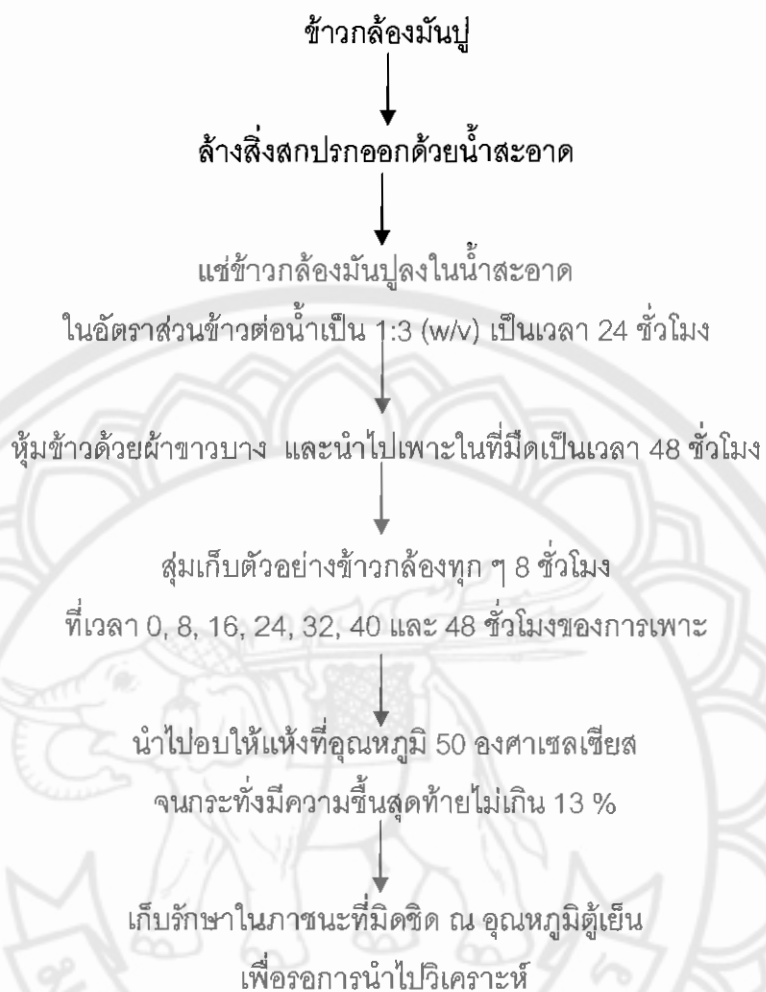
แยกล้างทำความสะอาดข้าวทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่าง โดยวิธีการแช่ข้าวลงในสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรท์ (NaClO) 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างทำความสะอาดข้าวอีกครั้งโดยการเปิดน้ำสะอาดไหลผ่านเมล็ดข้าวนานประมาณ 3 นาที

1.2 การเตรียมการงอก

หลังจากทำความสะอาดข้าวทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว แช่ข้าวเปลือกและข้าวกล้องมันญี่ปุ่นในน้ำประปาในอัตราส่วนข้าว : น้ำ เป็น 1 : 3 (w/v) (Ohtsubo, et al., 2005) ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเมล็ดข้าวต้องการน้ำมากในช่วงระยะแรกของการงอก ฉะนั้นจึงต้องทำการแช่น้ำก่อนที่จะนำไปเพาะเป็นเวลา 12–24 ชั่วโมง (จำรัส โปรงศิริวัฒนา, 2534) และจากผลการทดลองเบื้องต้น (Preliminary Study) พบว่า การแช่น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมล็ดจะงอกได้ดีกว่าเมื่อแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสามารถช่วยลดระยะเวลาในการเพาะให้สั้นลงได้ จากนั้นนำตัวอย่างข้าวทั้งสองตัวอย่างไปเพาะต่อในที่มีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างข้าวทั้งสองตัวอย่างทุก ๆ 8 ชั่วโมง (ที่ 0, 8, 16, 24, 32, 40, และ 48 ชั่วโมง ของการเพาะ) จากนั้นนำตัวอย่างข้าวไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง และอบจนกระทั่งมีความชื้นสุดท้ายไม่เกิน 13 % นำข้าวเปลือกไปผ่านกระบวนการขัดสีเพื่อกะเทาะเอาเปลือกออกจนได้เป็นข้าวกล้อง ดังแสดงขั้นตอนและกรรมวิธีการงอกในภาพ 5 - 6 สุดท้ายนำตัวอย่างข้าวกล้องที่ได้จากข้าวทั้ง 2 ตัวอย่าง ไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารแล้วบรรจุเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อการนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GABA ต่อไป



ภาพ 5 การเตรียมการส่งออกของข้าวเปลือก



ภาพ 6 การเตรียมการรอกของข้าวกล้องมันปู

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณ GABA ในข้าวกล้องมันปู

ทำการศึกษาวិเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณ GABA ในข้าวกล้องบดละเอียด ที่ได้จากตัวอย่างข้าวทั้งสองกลุ่ม คือ ข้าวเปลือก และข้าวกล้องมันปู ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ซึ่งมีสภาวะการใช้เครื่อง HPLC คือ Flow Rate 0.6 ml/min, C₁₈ Column เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) แบบ Isocratic ที่ใช้ในการศึกษา คือ สารละลาย A ต่อ B ในอัตราส่วน 80:20 โดยสารละลาย A ประกอบด้วย Aqueous Solution of 8.205 g of Sodium Acetate, 0.5 ml of Triethylamine, 0.7 ml of Acetic Acid, and 5.0 ml of Acetonitrile in 1000 ml of Distilled Water และสารละลาย B ประกอบด้วย Acetonitrile: Water 60:40 และตรวจวัดปริมาณ GABA ด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 254 nm ตามวิธีการของ Wang, Lee and Pan (2004) ซึ่งสามารถอธิบายได้ ดังนี้

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

2.1.1 ชั่งข้าวกล้องมันปูบดละเอียดจำนวน 1 กรัม จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำตัวอย่างไปสกัด โดยการนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.1.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างข้างต้นมา 1 มิลลิลิตร และนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator)

2.1.3 เติมสารละลายผสมของ Ethanol: Water: Triethylamine (2:1:1) ลงไป 0.2 มิลลิลิตร และนำไประเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จากนั้นเติมสารละลายผสมของ Ethanol: Water: Triethylamine: Phenylisothiocyanate (7:1:1:1) 0.3 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

2.1.4 นำไปทำให้แห้งอีกครั้ง เพื่อระเหยเอาสารส่วนเกินออก จากนั้นนำไปละลายในสารละลาย Mobile Phase กรองและนำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2.2 การวิเคราะห์

2.2.1 ฉีดสารที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างปริมาตร 60 μ l เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งมีสภาวะการทำงานดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ด้วยหลอดฉีดสาร (Syringe) ขนาด 100 μ l

2.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของ GABA ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 80 ppm

2.2.3 คำนวณหาความเข้มข้นของ GABA จากพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างข้าวมันปู เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

ตัวอย่างการคำนวณ

ในการสกัดตัวอย่างใช้ข้าวกล้องงอก 1 g ละลายในน้ำ 5 ml

ภายหลังจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน พบว่า มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.559 ppm ซึ่งเทียบได้เท่ากับ 1.559 $\mu\text{g/ml}$

สารละลายตัวอย่าง 1 ml มีปริมาณ GABA เท่ากับ 1.559 μg

สารละลายตัวอย่าง 5 ml มีปริมาณ GABA เท่ากับ $1.559 \times 5 = 7.795 \mu\text{g}$

สารละลายตัวอย่าง 5 ml มีปริมาณ GABA เท่ากับ $7.795/1000 = 0.007795 \text{ mg}$

ดังนั้นข้าวกล้องงอก 1 g มีปริมาณ GABA เท่ากับ 0.007795 mg และเมื่อคิดต่อ 100 g ตัวอย่างข้าว จะเท่ากับ 0.7795 mg (0.78 mg/100 g rice)

2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ด้วยเทคนิค Analysis of Variance (ANOVA) และแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง (ปริมาณ GABA) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทำการคัดเลือกหาสภาวะการงอกที่เหมาะสมของข้าวมันญี่ปุ่น จากสภาวะที่ให้ปริมาณ GABA สูงสุด

ตอนที่ 3 การศึกษาการประยุกต์ใช้ข้าวกล้องงอกในผลิตภัณฑ์อาหาร

3.1 การศึกษาและพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อสุขภาพจากข้าวกล้องงอก

3.1.1 การคัดเลือกสูตรพื้นฐานและกรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต

ทำการพัฒนาสูตรพื้นฐาน และกรรมวิธีที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ตจากข้าวกล้องงอก จากสูตรพื้นฐาน 3 สูตร ซึ่งในแต่ละสูตรมีการประยุกต์ใช้เชื้อจุลินทรีย์จากหัวเชื้อโยเกิร์ต และมีปริมาณสัดส่วนหรือส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ส่วนผสมและสัดส่วนที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ตสูตรต่าง ๆ

ส่วนผสม	ปริมาณ (กรัม)		
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3
นมโคสด	100	100	100
นมผง	4	4	2.5
น้ำตาล	-	5	3
เจลาติน	0.3	-	-

กรรมวิธีในการผลิตโยเกิร์ต

1. นำนํ้านมสดหรือนํ้านมขาดมันเนย อุณหภูมิห้องที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
 2. ปรับมาตรฐานของนํ้านมที่ใช้ให้มีปริมาณของแข็งทั้งหมด 18 % โดยการเติม 3 – 5 % ของ Dry Skim Milk Solid และนำไปโฮโมจีไนส์ให้เข้ากัน
 3. นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 83 – 89 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส
 4. เติมเชื้อจุลินทรีย์จากหัวเชื้อโยเกิร์ต 17 % และหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง หรือเมื่อมีค่า pH ประมาณ 4.4 – 4.5
 5. นำไปทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว เพื่อหยุดการหมักที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ทำการคัดเลือกสูตรพื้นฐานในการผลิตโยเกิร์ตตามกรรมวิธีข้างต้น โดยอาศัยการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ 9-Point Hedonic Scale (9 = ชอบมากที่สุด, 5 = เฉย ๆ และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด) ด้วยวิธีการประเมินจากความชอบด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมของผู้ทดสอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ในกลุ่มผู้ทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 30 คน

3.1.2 การศึกษาสัดส่วนและปริมาณการประยุกต์ใช้ข้าวกล้องมันปูออกในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

ศึกษาปริมาณการประยุกต์ใช้ข้าวกล้องมันปูออกที่ให้ปริมาณ GABA สูงสุด จากสภาวะการงอกที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโยเกิร์ตเพื่อสุขภาพ ในการทดลองแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 40 % (w/w) ตามลำดับ โดยขั้นตอนการเตรียมข้าวกล้องมันปูแสดงในภาพ 7

ทำการศึกษาความชอบของกลุ่มผู้ทดสอบ โดยอาศัยการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 9-Point Hedonic Scale (9 = ชอบมากที่สุด, 5 = เฉย ๆ และ 1 = ไม่ชอบมากที่สุด)

การวิเคราะห์ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสขั้นตอน 3.1.1 และ 3.1.2 ทำโดยการประยุกต์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ทำการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี ANOVA และจำแนกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพ 7 ขั้นตอนการเตรียมข้าวกล้องมันปุงอก เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโยเกิร์ต

3.1.3 การศึกษาและพัฒนาคุณลักษณะทางด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อสุขภาพจากข้าวกล้องงอก

ทำการพัฒนาและปรับปรุงคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่ สี, กลิ่นโยเกิร์ต, กลิ่นข้าว, รสเปรี้ยว และความข้นหนืด ภายหลังจากที่มีการเสริมข้าวกล้องงอกลงไป ในกระบวนการผลิต โดยการประยุกต์ใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Just-About-Right-Scale (JAR) ในการทดสอบกลุ่มตัวอย่างผู้ทดสอบจำนวน 40 คน ซึ่งในการศึกษาทดลอง จะใช้การทดสอบแบบ 5 สเตจ คือ Much Too Strong, Too Strong, Just About Right, Too Weak และ Much Too Weak (Stone and Sidel, 1992) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง) นำข้อมูลของคุณลักษณะทางด้านต่าง ๆ ที่ได้มาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป เพื่อให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากข้าวกล้องงอกเป็นที่ยอมรับ และได้รับคะแนนความชอบจากผู้บริโภคหรือกลุ่มผู้ทดสอบมากที่สุด (Most Acceptable)

3.2 การศึกษาการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากข้าวกล้องงอก

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากข้าวกล้องงอก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยทำการสำรวจความคิดเห็นของกลุ่มตัวอย่างผู้บริโภคจำนวน 150 คน ด้วยวิธีการใช้แบบสอบถามด้านความชอบแบบ 7-Point Hedonic Scale ซึ่งแบบสอบถามประกอบไปด้วยส่วนของข้อมูลส่วนบุคคล ข้อมูลการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ และการสอบถามการตัดสินใจในการซื้อผลิตภัณฑ์ของกลุ่มตัวอย่างผู้บริโภค โดยแบ่งการสอบถามออกเป็น 2 ส่วน คือ ก่อนและหลังการให้ข้อมูล GABA ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ง

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ แสดงค่าความถี่ และศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการตัดสินใจในการซื้อของผู้ทดสอบด้วยวิธี Chi-Square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3.3 การวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตจากข้าวกล้องงอก

3.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณ GABA ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อสุขภาพจากข้าวกล้องงอก ตามวิธีการของ Wang, Lee and Pan (2004)

3.3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ (Proximate Analysis) ซึ่งได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC. (1995) (รายละเอียดในภาคผนวก ค)

3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ระยะเวลาการทำวิจัย และสถานที่ทำวิจัย

ระยะเวลาในการทำวิจัยคือ 12 เดือน เริ่มตั้งแต่ เมษายน 2550 ถึงเดือน มีนาคม 2551
สถานที่ทำการวิจัยคือ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและ
สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

