

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

กระเทียมพันธุ์ศรีสะเกษ ที่มีเขตเพาะปลูกอยู่ที่ อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุดิบ

1. Sodium hydroxide (AR grade)
2. Boric acid (AR grade)
3. Hydrochloric acid (AR grade)
4. Selenium reagent mixture (AR grade)
5. Sulfuric acid (AR grade)
6. Petroleum ether (AR grade)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดไขมัน

สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอัลลิจินโดยจุลินทรีย์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA)

สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดแป้งออกจากกระเทียม

1. เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส (Termyl 120 L)
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 5.9 6.4 6.9 7.4 และ 7.9 (รายละเอียดในภาคผนวก ข.6)
3. สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

1. แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 33 (รายละเอียดในภาคผนวก ข.4)
2. กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (รายละเอียดในภาคผนวก ข.5)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเส้นใยอาหาร

Sulfuric acid (AR grade)

3.3 อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. ชุดย่อยและกลั่นโปรตีน Kjeldaltherm and Vapodest Gerhardt, KT 85)
2. เตาเผาช่วงอุณหภูมิ 500-700 องศาเซลเซียส (Furnace Carbolite, MEL 11-2)
3. เตาอบช่วงอุณหภูมิ 0-250 องศาเซลเซียส (WTB Binder, E53)
4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, A200S)
5. เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (Commercial blender, Waring)
6. อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน (Soxtherm Automatic, S-226)

อุปกรณ์ในการผลิตเส้นใยอาหารจากหัวกระเทียม

1. นาฬิกาจับเวลา (Casio, HS-5M)
2. ตะแกรงขนาดรูดอด 100 mesh
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BA4100S)
4. เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray Dryer)
5. เครื่องปั่นของแห้ง (Philips, HR 2836)

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

1. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) (Tomy, SS-3201)
2. เครื่องปั่นความเร็วรอบสูง (Commercial blender, Waring)
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) ช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส
4. 0.2 μm Steriled pyrogen free membrane filter

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส (แสดงในภาคผนวก ง.)

3.4 วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี (รายละเอียดดังอธิบายในภาคผนวก ก.)

1. วิเคราะห์ความชื้น โดยคำนวณน้ำหนักที่หายไปหลังผ่านการอบแห้ง (AOAC: 925.09 B, 1995) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.1)
2. วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC: 991.23, 1995) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.2)
3. วิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์สกัด (AOAC: 920.39, 1995) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.3)
4. วิเคราะห์หาปริมาณเถ้า โดยคำนวณน้ำหนักที่หายไปหลังการเผา (AOAC: 923.03, 1995) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.4)
5. วิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย (AOAC: 972.10, 1995) (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.5)
6. วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก.6)

วิธีวัดทางกายภาพ (รายละเอียดอธิบายในภาคผนวก ข.)

1. วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (Weber, 1993)
2. วัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Weber, 1993)
3. วัดค่าความอัตราการคายน้ำ (Weber, 1993)
4. วัดปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ (Polarimetric Method)
5. การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของเส้นใยอาหารที่ผลิตได้ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.)

1. วิเคราะห์ปริมาณเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (Prosky, 1999)
2. ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน โดย Modification of Southgate's Method

วิธีประเมินผลการยอมรับทางประสาทสัมผัส (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.)

ให้ผู้ทดสอบทั้งฝึกฝนจำนวน 20 คน ซึ่งเป็นนิสิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของขนมปังจิตเสริมเส้นใยกระเทียมตามแบบทดสอบเชิงพรรณนา (Quantitative Descriptive Analysis with Scoring) ตามแบบทดสอบในภาคผนวก ง.3

3.5 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1. ศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวกระเทียม

นำหัวกระเทียมทั้งหัวมาบดด้วยเครื่องบดของแห้ง Philips รุ่น HR2836 แล้วมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และเส้นใยหยาบ วิเคราะห์ 3 ซ้ำแล้วหาเฉลี่ย

3.5.2. ศึกษาวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดไขมันออกจากกระเทียม

3.5.2.1 การกลั่นด้วยไอน้ำ (Direct Steam Distillation)

นำหัวกระเทียมทั้งเปลือกปริมาณ 100 กรัม บดด้วยเครื่องบดของแห้ง Philips รุ่น HR2836 ให้ละเอียดประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำมาสกัดไขมันออกด้วยไอน้ำที่ความดันบรรยากาศ โดยการนำกระเทียมที่ผ่านการบดขนาดแล้วมากระจายตัวในน้ำเดือด แล้วต่อเข้ากับส่วนควบแน่น แปรเวลาการสกัดเป็น 5 ระดับ คือ 2.0 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 ชั่วโมง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

ติดตามผลการสกัดไขมัน โดยพิจารณาจากปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในกากกระเทียม วิเคราะห์ด้วยวิธี Soxhlet (AOAC, 1995)

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ร้อยละปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในกากกระเทียมแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

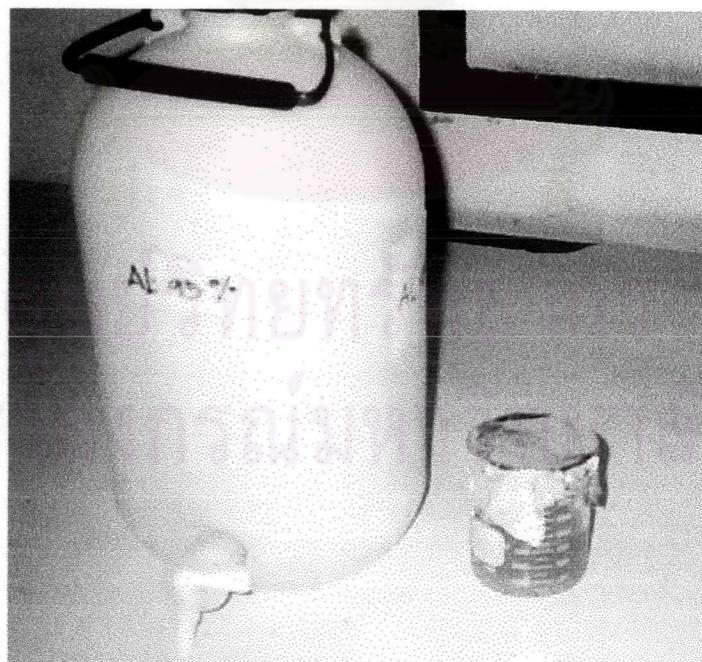
3.5.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

นำหวักระเทียมทั้งเปลือกปริมาณ 100 กรัม บั่นด้วยเครื่องบดของแห้ง Philips รุ่น HR2836 ให้ละเอียดประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำมาสกัดไขมันออกด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดย

1. นำกระเทียมที่ผ่านการบั่นลดขนาดแล้ว 100 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงไปโดยแปรปริมาณเอทานอลที่ใช้ (มิลลิลิตร) เป็น 1 2 3 และ 4 ส่วน ต่อน้ำหนักกระเทียม (กรัม) 1 ส่วน และแปรเวลาในการแช่เป็น 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง
3. ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 3.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ติดตามผลการสกัดไขมัน โดยพิจารณาจากปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในกากกระเทียม วิเคราะห์ด้วยวิธี Soxhlet (AOAC, 1995)

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ร้อยละปริมาณไขมันที่เหลืออยู่ในกากกระเทียม ใช้ Symmetric Factorial Experiment ขนาด 4x4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test



ภาพที่ 3.1 การสกัดไขมันออกจากกระเทียมด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

3.5.2.3 ตรวจสอบปริมาณอัลลิซินที่เหลืออยู่ โดยการเลี้ยงเชื้อ

ตรวจสอบว่าปริมาณอัลลิซินที่เหลืออยู่ในกากกระเทียม จะมีผลในการทำลายจุลินทรีย์หรือไม่ โดยจุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Staphylococcus aureus* (LTH 928) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ถูกทำลายโดยอัลลิซินได้ง่ายที่สุด (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2542) ในอาหาร Trypticase Soy Broth ทำการทดลองโดย

1. นำกากกระเทียมที่สกัดไขมันออกแล้วจากข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2 มาปั่นกับน้ำกลั่นในอัตราส่วนกระเทียม 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 วินาที
 2. เหยียงแยก (Centrifuge) ที่ 2500 รอบต่อนาที 20 นาที นำส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อ 0.2 μm Sterile pyrogen free membrane filter
 3. นำส่วนของเหลวที่กรองได้มาใส่ในเชื้อ *S.aureus* ที่รู้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แน่นอนประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยแปรปริมาณน้ำสกัดกระเทียมทั้ง 2 ชนิดเป็นร้อยละ 0 3 5 10 และ 15 ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำสกัดจากกระเทียมสดร้อยละ 3
- ติดตามผลปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ทุก 6 ชั่วโมง โดยวิธี Spread Plate ในอาหาร Trypticase Soy Agar

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่แบบ Completely Randomized Design ทดลอง 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.5.3 การสกัดแป้งออกจากกระเทียมด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α -Amylase)

เอนไซม์ที่ใช้คืออัลฟาอะไมเลส (Termamyl 120L) ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ 120 หน่วย ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก บริษัท East Asiatic ประเทศไทย จำกัด (มหาชน)

3.5.3.1 หาเส้นกราฟมาตรฐานของกิจกรรมเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

ทำการทดลองโดย

1. เตรียมน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 0.1-5.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับกรดไดโนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร
3. ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

1. วัดค่าความดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer (ดังภาพที่ 3.2) จากนั้นสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้
2. คำนวณหาความชันของเส้นกราฟและสมการของกราฟเส้นตรงที่ได้ เพื่อใช้เป็นสมการมาตรฐานของการหากิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมายเลสที่ใช้



ภาพที่ 3.2 เครื่อง Spectrophotometer

3.5.3.2 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองโดย

1. เตรียม Standard Soluble Starch โดยใช้ Soluble Starch 1 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ Volumetric Flask
2. นำ Standard Soluble Starch ที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์อัลฟาอะมายเลส 0.5 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดต่าง (pH) ให้เป็น 6.9 โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

3. แปรอุณหภูมิเป็น 10 ระดับ คือ 15 25 35 45 55 65 75 85 95 และ 105 องศาเซลเซียส บ่ม 3 นาที
4. นำมาทำปฏิกิริยากับกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์กับเส้นกราฟมาตรฐาน (รายละเอียดดังอธิบายในภาคผนวก ข.5)

3.5.3.3 หาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

ทำการทดลองโดย

1. นำ Standard Soluble Starch ที่เตรียมได้ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์ อัลฟาอะมัยเลส 0.5 มิลลิลิตร
2. บ่ม 3 นาที ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แปร pH เป็น 5 ระดับคือ 5.9 6.4 6.9 7.4 และ 7.9 โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์
3. นำมาทำปฏิกิริยากับกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์กับเส้นกราฟมาตรฐาน

3.5.3.4 หาความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการทดลองโดย

1. บ่มเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสที่ใช้ ที่ pH 6.9 โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 45 65 85 และ 95 องศาเซลเซียส แปรเวลาการบ่มเป็น 6 ระดับ คือ 0 1 2 3 4 และ 5 ชั่วโมง
2. นำเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มแล้ว 0.5 มิลลิลิตร มาหยอ Standard Soluble Starch 0.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที
3. นำมาทำปฏิกิริยากับกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แล้วคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ที่เวลาต่างๆกับเส้นกราฟมาตรฐาน

3.5.3.5 กำจัดแบ่งออกจากกระเทียมโดยใช้เอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส

ทำการทดลองโดย

1. นำกระเทียมที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว มาสกัดเอาไข (Wax) และรงควัตถุ (Pigment) ออกด้วย Ether 1-2 ครั้ง ฝั่งลมประมาณ 1 ชั่วโมง
2. นำกากกระเทียมที่ได้มากระจายตัวในน้ำเดือดในบีกเกอร์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นาน 10 นาที เพื่อให้แบ่งเป็นเจล เติมสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่ pH 6.9 ลงไปอีก 4 เท่า
3. เติมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส โดยแปรปริมาณเอนไซม์เป็น 4 ระดับคือร้อยละ 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 ของน้ำหนักกระเทียม และแปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 4 ระดับ คือ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ โดยบ่มใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 การย่อยแบ่งออกจากกระเทียมที่ 25 องศาเซลเซียส

4. เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ลงไปอีก 4 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ทำการเหวี่ยงแยกที่ 2500 รอบต่อนาที 10 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป แล้วนำกากที่ได้มาล้างด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 อีก 2 ครั้ง เหวี่ยงแยกที่ 2500 รอบต่อนาที 10 นาที
5. นำกากที่ได้มาระเหยเอทานอลออกบน Water Bath ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปแผ่บนถาดอะลูมิเนียมเคลือบเทฟลอนให้มีความหนาไม่เกิน 2 มิลลิเมตร อบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส 14-16 ชั่วโมง ให้มีความชื้นเหลือไม่เกินร้อยละ 5 บดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาดรูตลอด 100 mesh

ติดตามผลการกำจัดแบ่งโดย

1. วิเคราะห์ค่าปริมาณแบ่งที่เหลือ (Polarimetric Method)
2. การอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity : WHC)
3. การคายน้ำ
4. การอุ้มน้ำมัน (Oil Absorption Capacity : OAC)

การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ แบบ Symmetric Factorial Experiment ขนาด 4x4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.6 วิเคราะห์องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เส้นใยอาหารจากกระเทียมที่ผลิตได้

1. วิเคราะห์หาร้อยละโดยน้ำหนักเส้นใยกระเทียมผงที่ผลิตได้
2. ร้อยละปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด (AOAC, 1995)
3. เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ โดยการสกัดด้วยน้ำร้อน
4. เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดย Modification of Southgate's Method

3.7 นำเส้นใยอาหารที่ผลิตได้มาทดลองใช้ในผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้คือขนมปังปอนด์ชนิดจืด โดยใช้สูตรต้นแบบของ UFM โดยแปรปริมาณเส้นใยที่เติมลงไปเป็น 5 ระดับ คือร้อยละ 0 5 10 15 และ 20 ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมดรวมน้ำ แล้วนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 20 คน ทำ 2 ซ้ำ ติดตามผลสี เนื้อขนมปัง รสขม กลิ่นกระเทียม ความนุ่มของเนื้อขนมปังและการยอมรับโดยรวม ใช้วิธีการทดสอบเชิงพรรณนา (Descriptive Analysis with Scoring) (แบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ง.6) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 2 ซ้ำวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย