บทที่ 3
การทดลอง

3.1 วัตถุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

1. แป้งข้าวเหนียวตราหมีคู่ดาว (ชนิดโม่น้ำดีพิเศษ) บริษัทพรชัยอุตสาหกรรม ชลบุรี (2003) จำกัด
2. เอนไซม์แอลฟา-อะมิเลส Termamyl® 120 L Type LS activity 120 KNU/g บริษัทอีสเอเชียติ๊ก
3. เกลือป่นตราปรุงทิพย์ บริษัท สหพัฒนพิบูล จำกัด
4. แป้งสาลีอเนกประสงค์ตราว่าว บริษัท ยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด

3.1.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1. กรดซัลฟุริก (J.T. Baker, USA) A.R. grade
2. กรดบอริก (Univa, Ajax Finechem, Australia) A.R. grade
3. กรดไฮโดรคลอริก (J.T. Baker, USA) A.R. grade
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia) A.R. grade
5. โพแทสซียมพาทาเลท (Univa, Ajax Finechem, Australia) A.R. grade
6. เมธิลเรด (Merck, Darmstadt, Germany) A.R. grade
7. เมธิลลีนบลู (Merck, Darmstadt, Germany) A.R. grade
8. สารเร่งปฏิกิริยา (Merck, Darmstadt, Germany) A.R. grade
9. ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italy) A.R. grade

สารเคมีที่ใช้ปรับ pH

1. กรดไฮโดรคลอริก (J.T. Baker, USA) A.R. grade
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia) A.R. grade

3.1.3 อุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (รุ่น 600, Memmert, Germany)
2. Buchi digestion unit (รุ่น K-424, Flawil, Switzerland)
3. Buchi digestion unit (รุ่น B-324, Flawil, Switzerland)
4. เตาเผา (รุ่น CWF 1200, Cabolite ,USA)

5. Soxhlet (รุ่น HC61, Gerhard, Germany)

6. เครื่อง evaporator (Eyela รุ่น SB-651, Tokyo Aikakikai , Japan)

7. เครื่อง Bohlin Rheometer (รุ่น C-VOR, Malvern instrument, UK)

8. เครื่องเหวี่ยงแยก (IEC MLLT1-RF, Thermo IEC, USA)

9. เครื่อง pH meter (รุ่น Cyberscan 1000, Eutech instrument, Singapore)

11.เครื่อง water bath shaker (รุ่น SW 23, Julabo Shake Temp, Germany)

12. เครื่อง Instron texture analyzer (รุ่น 5565, Instron, USA)

13. เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 3 ตำแหน่ง (Precisa รุ่น XT 920M, Switzerland)

14. เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB204, Switzerland)

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเหนียว

3.2.1.1 ปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1995) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.1

3.2.1.2 ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ AOAC (1995) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.2

3.2.1.3 ปริมาณไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1995) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.3

3.2.1.4 ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1995) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.4

3.2.1.5 ปริมาณเส้นใย (crude fiber) ตามวิธีของ AOAC (1995) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.5

3.2.1.6 คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.6

3.2.1.7 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนโดย HPLC-ELSD ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.7

3.2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงโดยใช้เอนไซม์ α-อะมิเลส

เตรียมน้ำแป้งเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 5.6 ด้วย NaOH เข้มข้น 0.1 N และ HCl เข้มข้น 0.1 N เติม $CaCl_2$ จนสารละลายมี $CaCl_2$ เข้มข้น 40 ppm จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กวนเป็นระยะๆ นาน 30 นาที เติมเอนไซม์ α-อะมิเลส (เข้มข้นร้อยละ 0.010 0.025 และ0.040 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปให้ความ

ร้อนใน water bath shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (80 85 และ 90 องศาเซลเซียส) หลังจากย่อยตามระยะเวลา (90 120 และ 150 นาที) หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยปรับ pH เป็น 3-4 ด้วย HCl เข้มข้น 0.1 N นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง ปรับ pH เป็น 7 ด้วย NaOH เข้มข้น 0.1 N นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสออก นำส่วนที่เป็นของแข็งไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง บดและร่อนผ่านตะแกรง 100 mesh จะได้เป็นแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง โดยแปรค่าความเข้มข้นเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการย่อยดังนี้

- ความเข้มข้นเอนไซม์ 3 ระดับ ได้แก่ร้อยละ 0.010 0.025 และ 0.040 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- อุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 80 85 และ 90 องศาเซลเซียส
- ระยะเวลาในการย่อย 3 ระดับ ได้แก่ 90, 120 และ 150 นาที

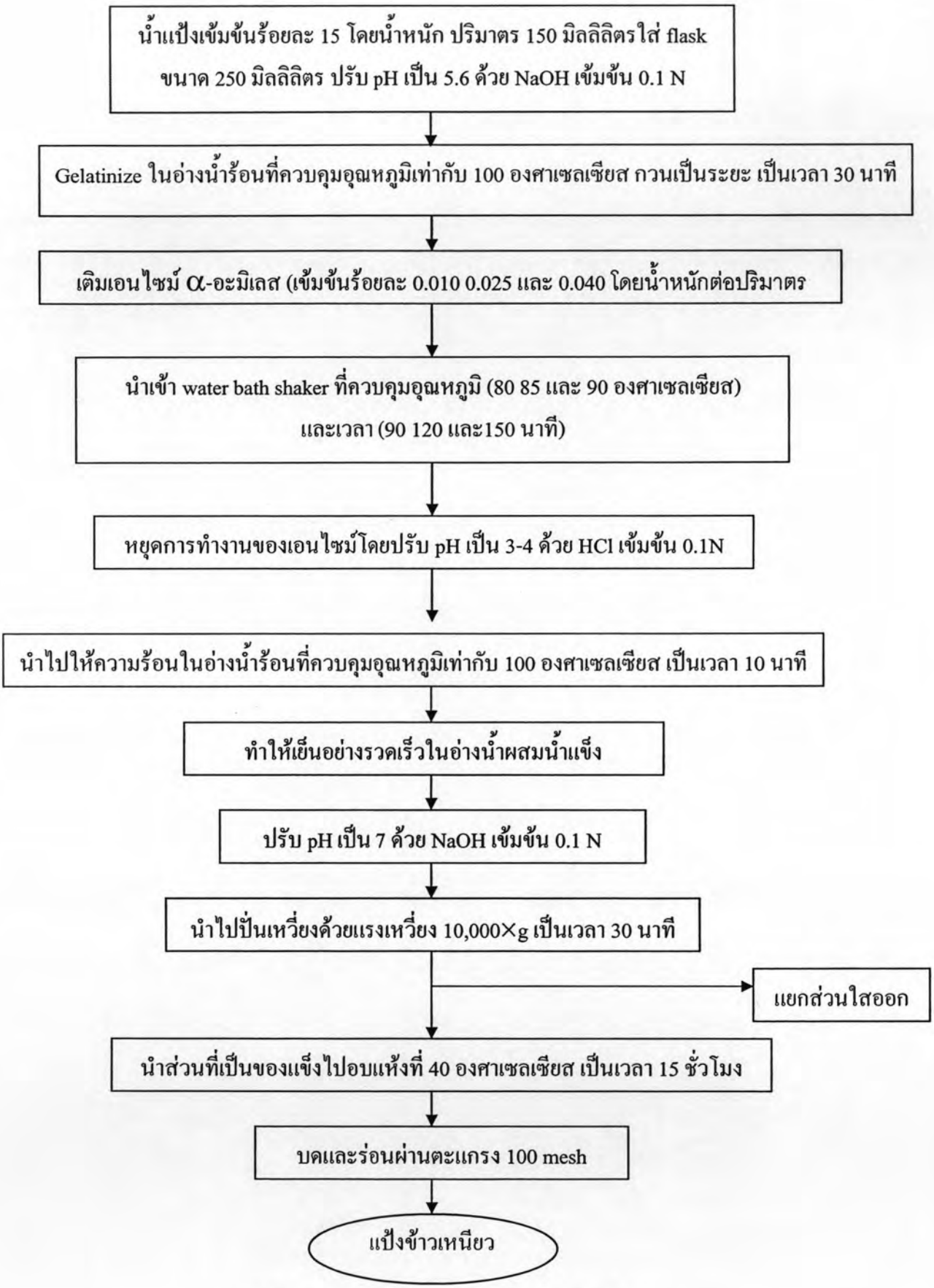
ตารางที่ 3.1 แสดงภาวะที่ทำการทดลอง และรูปที่ 3.1 แสดงแผนผังการทดลอง นำแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงที่ได้มาวิเคราะห์โปรตีนตามข้อ 3.2.1.2 และคำนวณร้อยละผลผลิตโดย

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงที่ผลิตได้}}{\text{น้ำหนักแป้งข้าวเหนียว}} \times 100$$

ออกแบบการทดลองแบบ Box-Benkhen ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Response Surface Methodology คัดเลือกภาวะที่เหมาะสม 3 ภาวะโดยมีข้อกำหนด เป็นภาวะที่สามารถผลิตแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงที่มีปริมาณโปรตีนอย่างน้อยร้อยละ 36 และมีร้อยละผลผลิตสูงสุด ความเข้มข้นเอนไซม์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.010-0.040 อุณหภูมิในการย่อยเท่ากับ 80 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการย่อยอยู่ในช่วง 90-150 นาที จากนั้นทำการทดลองผลิตแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงตาม 3 ภาวะนี้และเลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยพิจารณาจากปริมาณโปรตีนในแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง และร้อยละผลผลิต วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Processing System (SPSS) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New multiple Range Test

ตารางที่ 3.1 ภาวะการผลิตแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงในการทดลองแบบ Box-Benkhen

ภาวะที่	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลาในการย่อย (นาที)
1	0.010	80	120
2	0.010	85	90
3	0.010	85	150
4	0.010	90	120
5	0.025	80	90
6	0.025	80	150
7	0.025	85	120
8	0.025	85	120
9	0.025	85	120
10	0.025	90	90
11	0.025	90	150
12	0.040	80	120
13	0.040	85	90
14	0.040	85	150
15	0.040	90	120



รูปที่ 3.1 แผนผังการผลิตแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง

3.2.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใย คาร์โบไฮเดรต และ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.2.4 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง

3.2.4.1 วิเคราะห์กำลังการพองตัวและร้อยละการละลายของแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Schoch (1964) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.8

3.2.4.2 ศึกษาพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงความหนืด โดยใช้เครื่องวัดการเปลี่ยนแปลงความหนืด (Rapid Visco-analyzer, RVA) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.9

3.2.5 ศึกษาการทดแทนแป้งข้าวสาลีด้วยแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงในการผลิตบะหมี่ white salted noodle

3.2.5.1 วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของแป้งสาลี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามข้อ 3.2.1.1- 3.2.1.6 ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.1-ก.6 และศึกษาพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงความหนืดตามข้อ 3.2.4.2 ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.9

3.2.5.2 ผลิต white salted noodle ที่ทดแทนแป้งสาลีด้วยแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง โดยแปรปริมาณการทดแทนด้วยแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 10 20 และ 30 โดยมีขั้นตอนการผลิตดังนี้ (ขั้นตอนการผลิตแสดงดังรูปที่ 3.2)

- ชั่งแป้งสาลีหรือ แป้งผสม 200 กรัม เกลือ 4 กรัม น้ำ 80 กรัม
- ใส่แป้งลงในอ่างผสม ผสมด้วยความเร็วต่ำ เติมน้ำเกลือ ผสมเป็นเวลา 5 นาที
- นำโดที่ได้มาพักไว้เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้พลาสติกคลุมโดไว้
- รีดโดด้วยเครื่องรีดแผ่นแป้งจนได้แผ่นโดที่มีความหนาประมาณ 1.5 มิลลิเมตร
- ตัดด้วยชุดลูกกลิ้งสำหรับตัดเส้นได้เป็นเส้นบะหมี่ white salted noodle ขั้นตอนการผลิตแสดงดังรูปที่ 3.2

3.2.5.3 ศึกษา rheological property ของโดบะหมี่ white salted noodle ที่มีการทดแทนแป้งสาลีด้วยแป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูงในสัดส่วนต่างๆ โดยใช้เครื่อง Rheometer ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.10

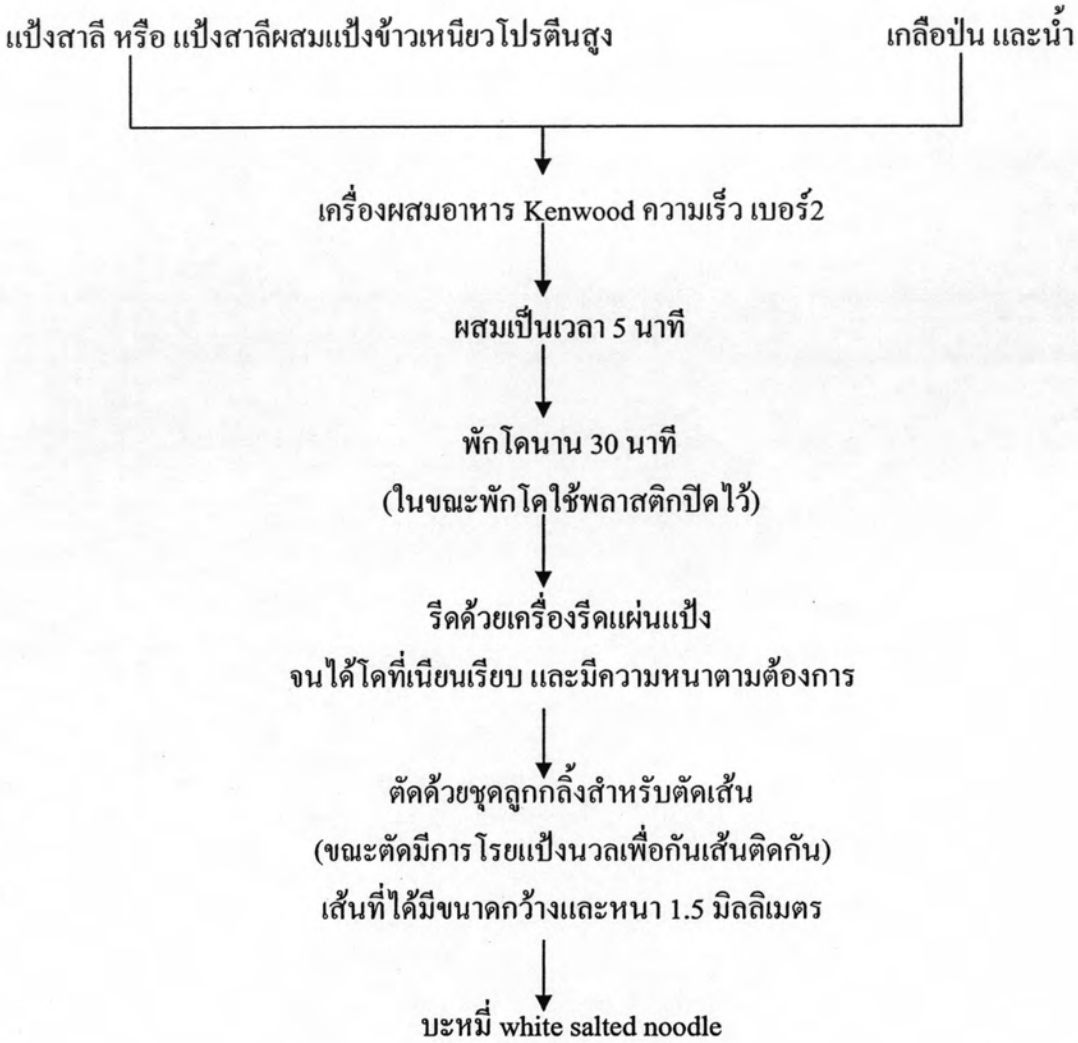
3.2.5.4 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของบะหมี่ได้แก่
การทดสอบเนื้อสัมผัสของบะหมี่ white salted noodle หลังต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด เป็นเวลา 1 นาที ด้วยเครื่อง Instron texture analyzer ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.11 และ cooking loss (Mestres, 1988) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก.12

3.2.5.5 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของบะหมี่ white salted noodle โดยนำบะหมี่มาต้มให้สุกนาน 1-2 นาที แช่น้ำเย็นเป็นเวลา 15 วินาที สะเด็ดน้ำแล้วให้ผู้ทดสอบให้คะแนนโดยใช้แบบทดสอบแบบ Quantitative Descriptive Analysis (QDA) และความชอบ (ภาคผนวก ข) ใช้ผู้ทดสอบ 15 คน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ออกแบบการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ตารางที่ 3.2 สูตรการทำบะหมี่ white salted noodle

สูตร	ปริมาณ (กรัม)			
	แป้งสาลี	แป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง	เกลือ NaCl	น้ำ
ควบคุม	100.0	0	2.0	40
แป้งสาลี : แป้งข้าวเหนียวโปรตีนสูง				
90 : 10	90.0	10.0	2.0	40
80 : 20	80.0	20.0	2.0	40
70 : 30	70.0	30.0	2.0	40



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการผลิตบะหมี่ white salted noodle