บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมแป้งกล้วยไข่

นำกล้วยไข่จากสวนเกษตรกร บ้านศรีประชา ตำบลชำฆ้อ อำเภอเขาชะเมา จังหวัดระยอง มาทำเป็นแป้งกล้วยไข่ (ดัดแปลงจากวิธีของ Anyasi et al., 2018) นำกล้วยไข่ลวกในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที และแช่ในน้ำเย็นทันที หลังจากนั้นนำกล้วยไข่มาปอกเปลือกกล้วยและหั่นเป็นชิ้นหนาประมาณ 2 มิลลิเมตร แช่ในน้ำสะอาดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำชิ้นกล้วยขึ้นพักให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 10 นาที นำกล้วยไข่ที่เตรียมได้ไปทดลองในขั้นต่อไป

3.2 การศึกษาผลของกรดอินทรีย์ที่มีผลต่อคุณภาพของแป้งกล้วยไข่

นำกล้วยไข่ที่เตรียมได้แช่ในสารละลายกรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก และกรดแลคติก ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำกล้วยขึ้นให้สะเด็ดน้ำ เรียงในถาดและทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมโครเมตร จะได้แป้งกล้วยไข่ คำนวณปริมาณร้อยละของผลผลิต จากสมการ [1] ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) และค่าสีด้วยระบบ L*, a*, b* ด้วยเครื่องวัดสี (Konica minota CR-400) คัดเลือกชนิดของกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

$$\text{ปริมาณผลผลิตแป้งกล้วย (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งกล้วย (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักกล้วยปอกเปลือก (กรัม)}} \qquad [1]$$

3.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีผลต่อคุณภาพของแป้งกล้วยไข่

นำกล้วยไข่ที่เตรียมได้แช่ในสารละลายกรดอินทรีย์ชนิดที่เหมาะสม ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำกล้วยขึ้นให้สะเด็ดน้ำ เรียงในถาดและทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมโครเมตร จะได้แป้งกล้วยไข่ คำนวณปริมาณร้อยละของผลผลิต จากสมการ [1] ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) และค่าสี ด้วยระบบ L*, a*, b* ด้วยเครื่องวัดสี คัดเลือกความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่เหมาะสมในการแช่กล้วยไข่เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.4 การศึกษาระยะเวลาการแช่กรดอินทรีย์ที่มีผลต่อคุณภาพของแป้งกล้วยไข่

นำกล้วยไข่ที่เตรียมได้แช่ในสารละลายกรดอินทรีย์ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลานำกล้วยขึ้นให้สะเด็ดน้ำ เรียงในถาดและทำแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมโครเมตร จะได้แป้งกล้วยไข่ คำนวณปริมาณร้อยละของผลผลิต จากสมการ [1] ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) และค่าสี ด้วยระบบ L*, a*, b* ด้วยเครื่องวัดสี ของแป้งกล้วยไข่

นำแป้งกล้วยไข่ที่เตรียมได้จากการแช่ในกรดอินทรีย์ที่ชนิด ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่ต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ กำลังการพองตัวและร้อยละการละลาย ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแป้งกล้วยไข่

3.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติของแป้งกล้วยไข่

นำแป้งกล้วยไข่ที่ผลิตได้จากการแช่ในกรดอินทรีย์ที่ชนิด ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมมาวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

3.5.1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งกล้วยไข่

วิเคราะห์หาปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC 2000

3.5.2 ปริมาณแป้งที่ต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การหาปริมาณแป้งที่ต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Resistant starch, RS) ดัดแปลงจาก AOAC Method 2002.02 (McCleary & Monaghan, 2002) และ AACC Method 32-40 (McCleary et al., 2013) โดยนำตัวอย่างแห้งปริมาณ 100±5 มิลลิกรัม เติมสารละลายโซเดียมมาลีเอต บัฟเฟอร์ (sodium maleate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอติก แอลฟา-อะไมเลส/อะไมโลกลูโคซิเดส (pancreatic α-amylase/amyloglucosidase, PAA/AMG) (PAA 0.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ AMG 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, Megazyme, Ireland) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในอ่างบ่มเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยวางหลอดย่อยในแนวนอนขนานกับการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเขย่าไป-กลับ 200 จังหวะต่อนาที เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เติมเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3250xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จำนวน 2 รอบ จากนั้นละลายส่วนตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ความเข้มข้น 1.7 โมล่าร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ตะกอนละลายหมด เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 1.2 โมล่าร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.8 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์อะไมโล-กลูโคซิเดส 3300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ด้วย GOPOD reagent (Megazyme, Ireland) และคำนวณปริมาณแป้งที่ต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จากสมการ [2]

RS (g/100g sample, %w/w) = $\Delta A \times F \times (100/0.1) \times (1/1000) \times (100/W) \times (162/180)$ [2]

Abs_{510nm} of glucose/100 µg = 1.0733, F = 93.1749, RS control sample (CRS) = 47.4%

โดยที่

ΔA	=	ค่าการดูดกลืนแสงเมื่ออ่านเทียบกับแบลงค์
F	=	factor ที่ใช้เปลี่ยนหน่วยจากค่าการดูดกลืนแสงเป็นไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส
100/0.1	=	volume correction (0.1 มิลลิลิตร จาก 100 มิลลิลิตร)
1/1000	=	ค่าการเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม
W	=	น้ำหนักแห้งของตัวอย่างในหน่วยมิลลิกรัม
	=	น้ำหนัก x [(100 – ปริมาณความชื้น)/100]
100/W	=	ค่าการเปลี่ยนหน่วยเป็นร้อยละ
162/180	=	factor สำหรับเปลี่ยน fee D-glucose เป็น anhydro-glucose

3.5.3 กำลังการพองตัวและร้อยละการละลาย

การหากำลังการพองตัวและร้อยละการละลาย ตามวิธีของ Schoch (1964) โดยชั่งตัวอย่างแป้งกล้วยไข่ 0.1 กรัม คิดเป็นน้ำหนักแป้งแห้ง (A) นำตัวอย่างแป้งใส่หลอดเหวี่ยงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 15 มิลลิลิตร นำหลอดปั่นเหวี่ยงแช่ในอ่างน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส กวนตลอดเวลา เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็วรอบ 2,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดน้ำใสตอนบนใส่ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (moisture can) นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปเก็บในโถดูดความชื้น (desiccators) ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักคงที่ คำนวณค่าน้ำหนักส่วนที่ละลายได้ (B) โดยนำค่าน้ำหนักที่วัดได้ลบน้ำหนักของภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น ส่วนแป้งเปียกที่อยู่ใน

หลอด นำไปคำนวณหาน้ำหนักแป้งที่พองตัวแล้ว (C) โดยชั่งน้ำหนักทั้งหลอดและหักลบน้ำหนักหลอดเปล่าออก คำนวณกำลังการพองตัวและร้อยละของการละลาย ดังสมการ [3] และ [4]

$$\text{การละลาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งส่วนที่ละลายน้ำ (B)} \times 100}{\text{น้ำหนักแป้งเริ่มต้น (A)}} \quad [3]$$

$$\text{กำลังการพองตัว (กรัมต่อกรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักแป้งที่พองตัวแล้ว (C)} \times 100}{\text{น้ำหนักแป้งเริ่มต้น (A)} \times (100 - \text{ร้อยละการละลาย})} \quad [4]$$

3.5.4 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของแป้งกล้วยไข่

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Chidambara, et al (2002) เตรียมแป้งกล้วยไข่ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำแป้งกล้วยไข่ที่เตรียมได้ปริมาณ 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocateu reagent 0.25 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของแป้งกล้วยไข่ไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูปมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมแป้งกล้วยไข่

3.5.5 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS radical scavenging assay ในตัวอย่างแป้งกล้วยไข่จากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

3.5.5.1 วิธี DPPH radical scavenging

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีของ Singhatong, et al. (2010) โดยปิเปตตัวอย่างแป้งกล้วยไข่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้กรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานและสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง ตามสมการที่ [1]

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรายงานผลเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ดังสมการ [5]

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A0-As)/A0] \times 100 \qquad [5]$$

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม และ As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

3.5.5.2 วิธี ABTS radical scavenging assay

ทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีของ Re, et al. (1999) เตรียมสารละลาย ABTS โดยผสม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต อัตราส่วน 1:0.5 ทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปิเปตตัวอย่างแป้งกล้วยไข่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้แอสคอร์บิกความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐานและสร้างกราฟมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง ตามสมการที่ [2] ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระรายงานผลเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ดังสมการ [6]

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = [(A0-As)/A0] \times 100 \qquad [6]$$

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม และ As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

3.6 การประยุกต์ใช้แป้งกล้วยไข่ในผลิตภัณฑ์ซาลาเปา

สูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์ซาลาเปา ประกอบด้วย แป้งสาลี 525 กรัม น้ำตาลทราย 150 กรัม ยีสต์ผง 12 กรัม เกลือ 5 กรัม ผงฟู 5 กรัม น้ำมันถั่วเหลือง 50 กรัม น้ำ 240 กรัม ขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์ซาลาเปา ทำได้โดยนำแป้งสาลีปริมาณ 375 กรัม น้ำตาลทราย 15 กรัม ยีสต์ 12 กรัม และน้ำ 200 กรัม ผสมในภาชนะนวดแป้ง ใช้พายคนให้เข้ากัน นวดมือหยาบๆ ใช้ผ้าข้าวบางชุบน้ำหมาดๆ หรือแผ่นพลาสติกคลุมแป้งไว้ พักแป้ง เป็นเวลา 40 นาที ใส่ส่วนผสมที่เหลือและนวนต่อจนไม่ติดมือ ตัดแบ่งแป้งชั่งก้อนละ 30 กรัม เรียงใส่ถาด ใช้ผ้าข้าวบางชุบน้ำหมาดๆ หรือแผ่นพลาสติกคลุมแป้งไว้ พักแป้ง เป็นเวลา 5 นาที รีดขอบแป้งเป็นแผ่นบางประมาณ 2 มิลลิเมตร ให้ตรงกลางเนื้อ

แป้งหนาเล็กน้อย ใส่ไส้ (ตามที่ต้องการ) แล้วห่อจีบแป้งวางบนกระดาษรอง วางเรียงในถาด ใช้ผ้าข้าวบางชุบน้ำหมาดๆ หรือแผ่นพลาสติกคลุมแป้งไว้ พักแป้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 40 นาที แป้งซาลาเปาจะมีลักษณะขึ้นฟูใหญ่ขึ้น นำไปนึ่งในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ซาลาเปา

นำแป้งแป้งกล้วยไข่ที่ได้ไปทดแทนแป้งสาลีร้อยละ 0, 10, 20, 30 และ 40 ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ซาลาเปาแป้งกล้วยตามขั้นตอนเหมือนกับสูตรพื้นฐาน นำผลิตภัณฑ์ซาลาเปาไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 20 คน ด้วยวิธี 9 – point hedonic scaling โดยคะแนน 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด และ คะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.7 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแป้งกล้วยและการวิเคราะห์คุณสมบัติของแป้งกล้วยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) และการทดสอบทางประสาทสัมผัส วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan’s multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี