บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการพัฒนากระบวนการผลิตข้าวงอกนึ่งเพื่อปรับปรุงคุณค่าโภชนาการ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

วัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ข้าวหอมใบเตย ได้จากไร่แสนดี อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องระเหย (Rotary evaporator : R-200 model, BUCHI, Switzweland)
2. เครื่องปั่นแบบมือจับ (MR 430 HC model, 300 Watt, Spain)
3. เครื่องกวนสารที่ควบคุมอุณหภูมิ (Stirrer, ARE model, VELP Scientifica, Italy)
4. เครื่องวัดอุณหภูมิ (Digital thermometer, DTM 305 model, TECPEL, Taiwan)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath : WB14 model, German)
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance : Sartorius, CP224S, German)
7. เครื่องอบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer)
8. เครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometry (SHIMADZU, Japan)
9. GC-MS Column (HP5 30M, U.S.A.)
10. เครื่องสีข้าว
11. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane : Commercial grade, Etalmar, Thailand)
2. เฮกเซน (Hexane : HPLC grade 99.5%, LAB-SCAN, Ireland)
3. เอทานอล (Ethanol : AR grade >95%, Merck, German)
4. เมทานอล (Methanol : AR grade >99.9%, Merck, German)
5. คลอโรฟอร์ม (Chloroform : AR grade 99.8%, LAB-SCAN, Ireland)
6. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl Ether : AR grade 99.5%, LAB-SCAN, Ireland)
7. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate : AR grade >99.0%, Merck, German)
8. ปิโตเลียมอีเทอร์ (Petroleum Ether : AR grade, LAB-SCAN, Ireland)
9. โทลูอีน (Toluene : AR grade >99.5%, LAB-SCAN, Ireland)

10. ยูเรีย (Urea : AR grade, Ajax Finechem)

11. บีเอชที (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, AR grade, Sigma-aldrich, German)

12. ไนโตรเจน (Nitrogen 99.99% : Lanna Industrial Gasses, Thailand)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. กระบวนการแช่ข้าว

นำข้าวมาทำการกะเทาะเปลือกให้อยู่ในรูปของข้าวกล้อง แล้วนำข้าวมาแช่น้ำที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8-24 ชั่วโมง โดยประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Thammapat *et al*. (2015) วางแผนการทดลองแบบ Hexagonal Rotatable Design ดังตารางที่ 3.1 หาพื้นที่ตอบสนองและสมการทำนายจากโมเดลแบบหุ่น คือ

$$Y=\beta_0+\Sigma\beta_i X_i+\Sigma\beta_{ii}X_i^2+\Sigma\Sigma\beta_{ij}X_iX_j$$

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองแบบ Hexagonal Rotatable Design ของกระบวนการแช่ข้าว

Coded- variable levels		Natural-variable levels	
Z_1	Z_2	X_1 (Soaking Temperature, °C)	X_2 (Soaking Time, h)
1.00	0.00	50.0	18.00
0.50	0.87	45.0	22.96
0.50	-0.87	45.0	9.04
-0.50	0.87	35.0	22.96
-0.50	-0.87	35.0	9.04
-1.00	0.00	30.0	8.00
0.00	0.00	40.0	8.00

1.1 หลังผ่านการแช่ข้าว นำข้าวไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวอย่างข้าวมีความชื้นน้อยกว่า 16% (d.b.)

1.2 นำข้าวที่ได้ไปทำการบดด้วยเครื่องบดชนิด hammer mill

1.3 นำข้าวที่ผ่านการบดร่อนผ่านตะแกรงร่อน (sieving) ขนาด 250 µm และเก็บตัวอย่างในถุงทึบแสงและเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอล (γ-Oryzanol)

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอลปรับปรุงจากวิธีของ Butsat and Siriamornpun (2010) โดยนำตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม มาสกัดด้วยอะซิโตนที่อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v)

2.2 ทำการปั่นผสมด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

2.3 ทำการละเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2.4 ละลายกลับด้วยเฮกเซนและนำไปวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอลโดยใช้ HPLC

3. กระบวนการงอกข้าว

นำข้าวที่ผ่านการแช่แล้ว ทำการงอกภายในตู้งอกความคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4. กระบวนการนึ่งข้าว

นำข้าวที่ผ่านการงอกแล้วมาทำการนึ่ง ภายใต้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 110-120 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10-30 นาที โดยประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Thammapat *et al*. (2016) วางแผนการทดลองแบบ Hexagonal Rotatable Design ดังตารางที่ 3.2 หาพื้นที่ตอบสนองและสมการทำนายจากโมเดลแบบหุ่น คือ

$$Y=\beta_0+\Sigma\beta_i X_i+\Sigma\beta_{ii}X_i^2+\Sigma\Sigma\beta_{ij}X_iX_j$$

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองแบบ Hexagonal Rotatable Design ของกระบวนการนึ่งข้าว

Coded- variable levels		Natural-variable levels	
Z_1	Z_2	X_1 (Steaming Temperature, $^{\circ}$C)	X_2 (Steaming Time, min)
1.00	0.00	120.0	20.00
0.50	0.87	117.5	25.00
0.50	-0.87	117.5	15.00
-0.50	0.87	112.5	25.00
-0.50	-0.87	112.5	15.00
-1.00	0.00	110.0	10.00
0.00	0.00	115.0	20.00

4.1 หลังผ่านการนึ่ง นำข้าวไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวอย่างข้าวมีความชื้นน้อยกว่า 16% (d.b.)

4.2 นำข้าวที่ได้ไปทำการบดด้วยเครื่องบดชนิด hammer mill

4.3 นำข้าวที่ผ่านการบดร่อนผ่านตะแกรงร่อน (sieving) ขนาด 250 µm และเก็บตัวอย่างในถุงทึบแสงและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้

5. การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอล

5.1 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอลปรับปรุงจากวิธีของ Butsat and Siriamornpun (2010) โดยนำตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม มาสกัดด้วยอะซิโตนที่อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:10 (w/v)

5.2 ทำการปั่นผสมด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

5.3 ทำการละเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.4 ละลายกลับด้วยเฮกเซนและนำไปวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอลโดยใช้ HPLC

6. การวิเคราะห์ค่าดัชนีน้ำตาล (Glycemic Index; GI)

6.1 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทนย่อยด้วยเอนไซม์ (Resistant starch)

6.1.1 ชั่งตัวอย่างแป้ง 100 ± 5 มิลลิกรัม ใสในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร

6.1.2 เติมเอนไซม์ผสมระหว่าง Pancreatic **α**-amylase และ AMG (3U/ml) 4 มิลลิลิตร ปิดหลอด

6.1.3. นำไปเขย่าแนวนอนที่ 200 rpm ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง (โดยวางหลอดในแนวขนานกับการเคลื่อนที)

6.1.4 เติมเอทานอล 99% ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา (ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g (ประมาณ 3000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที

6.1.5 ถ่ายของเหลวส่วนใสจากหลอดเดิมใส่อีกหลอดอย่างระมัดระวัง

6.1.6 เติมเอทานอล 50% โดยปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในส่วนของตะกอน ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer แล้วเติม เอทานอล 50% โดยปริมาตรอีก 6 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 1500 g (ประมาณ 3000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที

6.1.7 ใส่ Magnetic bar ลงในหลอดที่มีตะกอน และเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากนโดยวางในถาดน้ำตั้งบน Magnetic stirrer เป็นเวลา 20 นาที

6.1.8 เติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (pH 3.8) ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด

6.1.9 เติมเอนไซม์ Amyloglucosidase (3300 U/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6.1.10 บ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 นาที

6.1.11 สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ RS มากกวา 10% นำสารละลายที่ออกจาก Water bath ถ่ายสารละลายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร กลั้วล้างหลอดและ Magnetic bar ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g (ประมาณ 3000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที

6.1.12 สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ RS น้อยกวา 10% นำสารละลายที่ออกจาก Water bath ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g (ประมาณ 3000 rpm) เป็นเวลา 10 นาที (ไมต้องทำการเจือจาสารละลาย) โดยปริมาตรสุดท้ายจะเป็น 10.3 มิลลิลิตร

6.1.13 ดูดสารละลายที่ได้จากข้อ 6.11 หรือ ข้อ 6.12 (ตาม % ของ RS) มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม GOPOD reagent 3 มิลลิลิตร บ่มใน Water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

6.1.14 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในแต่ละหลอดที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

6.1.15 คำนวณปริมาณแป้งทนย่อยด้วยเอนไซม์ (RS) ตามสูตร

ปริมาณ RS (กรัม/ 100 กรัมตัวอย่าง) = E x F/W x 162/180

เมื่อ E = ค่าการดูดกลืนแสง

F = ปริมาณกลูโคสที่วิเคราะห์ได้

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ (กรัม)

162/180 = แฟกเตอร์สำหรับเปลี่ยน Free D-glucose เป็น Anhydro-glucose

6.2 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch content)

6.2.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 100±5 มิลลิกรัม (น้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงในหลอดทดลอง

6.2.2 เติมเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติม Dimethyl sulphoxide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันที

6.2.3 เขย่าให้เข้ากัน และนำไปไว้ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายเอ็นไซม์ Thermostable **α**-amylase ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทันที และนำไปไว้ในน้ำเดือดเป็นเวลา 6 นาที

6.2.4 ทำการเขย่าทุกๆ 2 นาที และนำสารละลายตัวอย่างมาพักไว้ในอ่างน้ำควบคุมที่ 50°C เพื่อให้ตัวอย่างสารละลายมีอุณหภูมิลดลงเป็น 50 องศาเซลเซียส

6.2.5 จากนั้นเติมสารละลายเอ็นไซม์ Amyloglucosidase ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที

6.2.6 ถ่ายสารละลายในหลอดทดลองลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.2.7 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายในส่วนใสปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลองและเติมสารละลาย Glucose determination reagent (GOPOD reagent) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 20 นาที

6.2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร และคำนวณหาแป้งทั้งหมดจากสูตร

ปริมาตรแป้งทั้งหมด (ร้อยละ) = $\Delta E \times (F/W) \times 90$

เมื่อ ΔE = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

F = ค่า Factor ของการเปลี่ยนแปลงหน่วยเป็นไมโครกรัมของกลูโคสในสารละลาย GOPOD reagent

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (มิลลิกรัม) ซึ่งคำนวณได้จาก

W = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ x [(100-ปริมาณความชื้น)/100]

6.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยโดยวิธี *In-vitro* starch digestion

6.3.1 นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดแล้วชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง

6.3.2 เติม **α**-amylase (125 U) ที่เตรียมด้วย Carbonate buffer (pH 7) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

6.3.3 เติมเอ็นไซม์ Pepsin ที่เตรียมด้วย 0.02 M Hydrochloric 5 มิลลิลิตร ภายใน 15-20 วินาที หลังจากเติม α-amylase

6.3.4 นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที โดยทำการเขย่าตลอดเวลา ด้วยความเร็ว 85 rpm

6.3.5 เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการปรับตัวอย่างให้เป็นกลางโดยการเติม 0.02 M Sodium hydroxide 5 มิลลิลิตร

6.3.6 เติม 0.02 M Sodium acetate buffer (pH 6) 25 มิลลิลิตร

6.3.7 เติมเอ็นไซม์ Pancreatin ที่เตรียมด้วย Acetate buffer 5 มิลลิลิตร

6.3.8 เติมเอ็นไซม์ Amyloglucosidase ที่เตรียมด้วย Acetate buffer 5 มิลลิลิตร

6.3.9 นำตัวอย่างที่เติมสารทั้งหมดแล้วบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง โดยระหว่างการบ่มทำการตรวจวัดปริมาณกลูโคสโดยใช้เครื่องตรวจวัดน้ำตาลที่เวลาต่างๆ (0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาที)

6.3.10 คำนวณหาแป้งที่ถูกย่อยต่อ 100 กรัม จากสมการ

$$D_s = \frac{0.9 x G_G x 180 x V}{W x S(100 - M)}$$

เมื่อ G_G = Glucometer reading (มิลลิโมลต่อลิตร)

V = ปริมาตรที่ได้จากการย่อย (มิลลิลิตร)

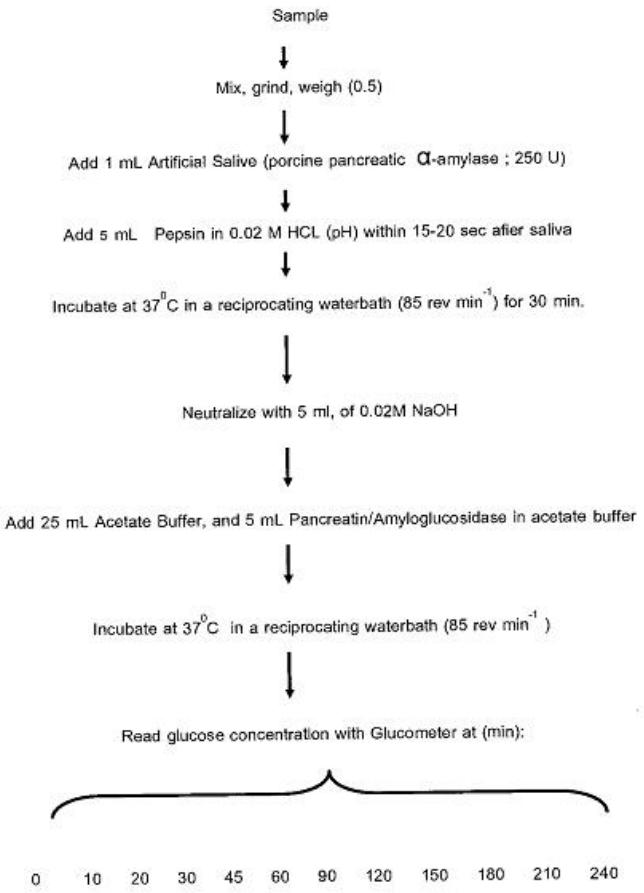
180 = มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

S = ปริมาณสตาร์ชทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง

0.9 = ค่าคงตัวที่ได้จากน้ำตาลกลูโคส

รายละเอียดของการวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยโดยวิธี *In-vitro* starchbdigestion ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แผนผังการวิเคราะห์ความสามารถในการย่อยโดยวิธี *In-vitro* starch digestion

6.4 การหาจลนพลศาสตร์ของอัตราการย่อยสตาร์ช

จลนพลศาสตร์ของอัตราการย่อยสตาร์ชอธิบายได้ด้วย Non-linear model ดังสมการ

$$D_t = D_0 + D_{\infty_{-0}}(1 - \exp[K_t]$$

เมื่อ D_t = ร้อยละ (g/100 g dry sample) ของสตาร์ชที่ถูกย่อย ณ เวลา t

D_0 = ร้อยละของสตาร์ชที่ถูกย่อย ณ เวลา t = 0

D_∞ = ร้อยละของสตาร์ชที่ถูกย่อยสุดท้าย (Infinity time)

K = ค่าคงที่อัตราการย่อย (min^{-1})

T = เวลา (นาที)

การคำนวณค่าดัชนีน้ำตาล (GI) โดยคำนวณค่า GI (H90) และค่า GI (HI) นำมาหาค่าเฉลี่ยดังสมการ

$$GI = [\frac{(30.21 + 0.803H_{90}) + (40.03 + 0.558HI)}{2}]$$