บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

ไข่ไก่ ซีพี เกรด AAAA	(บริษัท วีฟู้ดโภคภัณฑ์ จำกัด)
น้ำมันถั่วเหลือง	(บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด มหาชน)
Glyceryl monooleate (GMO)	(บริษัท อิมพีเรียล อินดัสเตรียล เคมิคัลส์ ประเทศไทย จำกัด)
Sorbitan monooleate (SMO)	(บริษัท อิมพีเรียล อินดัสเตรียล เคมิคัลส์ ประเทศไทย จำกัด)
Lecithin (LC)	(บริษัท ไฮน์วินแซนด์ จำกัด)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

Acetic acid	(Food grade)
Potassium hydroxide	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

Sulfuric acid	(A.R.)
Boric acid	(A.R.)
Sodium hydroxide	(A.R.)
Bromocresol green	(A.R.)
Methyl red	(A.R.)
Copper sulfate	(A.R.)
Potassium sulfate	(A.R.)
Hydrochloric acid	(A.R.)
Diethyl ether	(A.R.)
Petroleum ether	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณฟอสโฟลิปิด

Sodium disulfide	(A.R.)
Sodium sulfite	(A.R.)
Amino-napthol-sulfamic acid	(A.R.)
Ammonium molybdate	(A.R.)
Disodium hydrogenphosphate dihydrate	(A.R.)
Hydrogen peroxide	(A.R.)
Methanol	(A.R.)
Dichloromethane	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเทอรอล

Potassium hydroxide	(A.R.)
Methanol	(A.R.)
Isopropanol	(A.R.)

น้ำยาวิเคราะห์คอเลสเทอรอล ของบริษัท Boehringer-mannheim ประกอบด้วย

- Ammonium phosphate buffer pH 7.0
- Acetylacetone
- Stabilizers
- Catalase
- Cholesterol oxidase
- Standard cholesterol solution (1 mg cholesterol / ml)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กรดไขมัน

Methanol	(A.R.)
Dichloromethane	(A.R.)
Potassium chloride	(A.R.)
Hexane	(A.R.)
Acetyl chloride	(A.R.)
Potassium carbonate	(A.R.)

อุปกรณ์

การผลิต

- เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Agimatic-N)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Hanna , 8417)
- เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Labofuge 15000)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto , 38G)
- Two-stages Homogenizer (APV Gaulin , 15MR-8TA)

การวิเคราะห์ทางเคมี

- เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius , AZ005)
- เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius , 1907 MPB)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Hanna , 8417)
- ตู้อบลมร้อน ช่วงอุณหภูมิ 0-250 องศาเซลเซียส
- ชุดย่อยกลั่นโปรตีน (Kjeldaltherm and Vapodest I , Gerhardt , KT85)
- ตู้ควัน
- Muffle furnace ช่วงอุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส (Carbolite , MEL II-2)
- Majonnier fat extraction tube
- Vacuum rotary evaporator (Buchi , Rotavapor R-114)
- Crusible

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta Chroma Meter , CR 300 Series)
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Digital Viscometer , DV-I+)

การวิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอล

- Heating/stirring module (Pierce , 18971)
- Mini shaker (Ika , MS1)
- Spectrophotometer (Spectronic 601 , Milton Roy)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto , 38G)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสและฟอสโฟลิปิด

- Sand bath (Gerhardt , HS22)
- Vortex (Genie-2 , G-560E)
- Spectrophotometer (Spectronic 601 , Milton Roy)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Heto , 38G)

การหาขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชัน

- Emulsion Quality Analyzer (Gaulin)

การวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมัน

- Vacuum rotary evaporator (Buchi , Rotavapor R-114)
- Gas chromatography (Fisons , GC 8000 Series II)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้คือ ไข่ไก่ ซีพี เกรด AAAA ขนาดน้ำหนัก 58-60 กรัม โดยแยกไข่แดงออกจากไข่ขาว ตีไข่แดงให้แตก คนให้ทั่ว กรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิด พ่นก๊าซไนโตรเจนลงไป ปิดฝาแล้ว seal ด้วย Parafilm นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาตรวจคุณภาพโดยวิเคราะห์ค่าต่างๆดังนี้ (ทดลอง 3 ซ้ำ)

1.1 ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.1

1.2 ปริมาณเถ้า วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.2

1.3 ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.3

1.4 ปริมาณไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.4

1.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น , เถ้า , โปรตีน และไขมันที่วิเคราะห์ได้

1.6 ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธีColorimetric ตามวิธีของ Boehringer-mannheim (1989) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.5

1.7 ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.6

1.8 วัดค่าความเป็นกรดด่าง

1.9 วัดค่าสี L , a และ b

1.10 องค์ประกอบของกรดไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lapage และ Roy (1986) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.8

1.11 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันถั่วเหลือง วิเคราะห์ตามวิธีของ Lapage และ Roy (1986) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.8

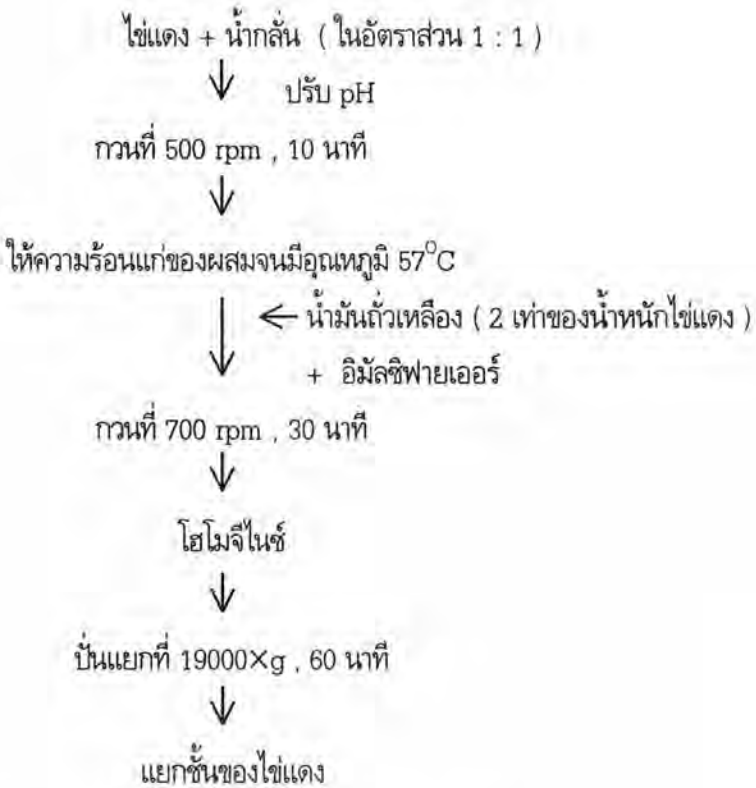
2. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่แดง

2.1 emulsifying capacity วิเคราะห์ตามวิธีของ Nath และ Newbold (1976) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.9

2.2 อุณหภูมิในการเกิด coagulation ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.10

3. ศึกษา pH ชนิดและปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

นำไข่แดงที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นมาหา pH ชนิด และปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง โดยปรับ pH ของไข่แดงที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 4.5 ด้วยสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 15% โดยปริมาตร ปรับpH เป็น 9.0 ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล แปรชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ 3 ชนิด ได้แก่ GMO SMO และ LC และแปรปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองเป็น 3 ระดับ คือ 8% 10% และ 12% โดยน้ำหนักน้ำมันถั่วเหลือง โดยมีขั้นตอนในการสกัดดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

3.1 ศึกษา pH และปริมาณ GMO ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

แปร pH ของไข่แดงที่เจือน้ำเป็น 2 ค่า คือ 4.5 และ 9.0 และแปรปริมาณ GMO ที่ใช้เป็น 3 ระดับ คือ 8% 10% และ 12% โดยน้ำหนักน้ำมันถั่วเหลือง สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 แต่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นไข่แดง

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ, 2536)

- ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric (Boehringer-mannheim , 1989)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2X3 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (Snedecor และ Cochran, 1967) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงเพื่อนำไปศึกษาต่อ

3.2 ศึกษา pH และปริมาณ SMO ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

แปร pH ของไข่แดงที่เจือน้ำเป็น 2 ค่า คือ 4.5 และ 9.0 และแปรปริมาณ SMO ที่ใช้เป็น 3 ระดับ คือ 8% 10% และ 12% โดยน้ำหนักน้ำมันถั่วเหลือง สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 แต่ไม่ผ่านการโฮโมจิไนซ์ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นไข่แดง

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ , 2536)

- ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric (Boehringer-mannheim , 1989)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2X3 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงเพื่อนำไปศึกษาต่อ

3.3 ศึกษา pH และปริมาณ LC ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

แปร pH ของไข่แดงที่เจือน้ำเป็น 2 ค่า คือ 4.5 และ 9.0 และแปรปริมาณ LC ที่ใช้เป็น 3 ระดับ คือ 8% 10% และ 12% โดยน้ำหนักน้ำมันถั่วเหลือง สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 แต่ไม่ผ่านการโฮโมจิไนซ์ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นไข่แดง

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ , 2536)

- ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric (Boehringer-mannheim , 1989)

วางแผนการทดลองแบบ Asymmetric Factorial Design ขนาด 2×3 ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงเพื่อนำไปศึกษาต่อ

3.4 ศึกษา pH ชนิดและปริมาณอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง ตามภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เลือกได้จากข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 เพื่อเลือก pH ชนิด และปริมาณอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง โดยสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 แต่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นไข่แดง

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ, 2536)

- ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธี Colorimetric (Boehringer-mannheim , 1989)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงเพื่อนำไปศึกษาต่อ

4. ศึกษาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงจากข้อ 3.4 มาใช้สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง โดยแปรปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เป็น 3 ระดับ คือ 2 3 และ 4 เท่าของน้ำหนักไข่แดง สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง ตามขั้นตอนดังรูปที่ 3.1 แต่ไม่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ แล้วนำไปปั่นแยกชั้นไข่แดง

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธี A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.
- วิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมันที่วิเคราะห์ได้
- วิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิด ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ , 2536)
- วิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอล โดยวิธี Colorimetric (Boehringer-mannheim ,1989)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงเพื่อนำไปศึกษาต่อ

5. ศึกษาความดันในการโฮโมจีไนซ์ ที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุด ในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงจากข้อ 4 มาใช้สกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง โดยแปรความดันที่ใช้ในการโฮโมจีไนซ์เป็น 1000 2000 และ 3000 psi

ประเมินคุณภาพของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.3
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธี A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.4
- วิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.2
- วิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิด ตามวิธี Modified Bartlett (วินัย ดะห์ลัน และคณะ , 2536)
- วิเคราะห์ปริมาณคอเลสเทอรอล โดยวิธีColorimetric (Boehringer-mannheim, 1989)
- หาขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชัน โดยวิธี Light Scattering (Gualin, 1982)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดง

6. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไข่แดงที่ได้

6.1 ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.1

6.2 ปริมาณเถ้า วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.2

6.3 ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.3

6.4 ปริมาณไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีของ A.O.A.C. (1990) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.4

6.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ได้จากการคำนวณผลต่างขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดกับผลรวมของปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมันที่วิเคราะห์ได้

6.6 ปริมาณคอเลสเทอรอล วิเคราะห์โดยวิธีColorimetric ตามวิธีของ Boehringer-mannheim (1989) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.5

6.7 ปริมาณฟอสโฟลิปิด วิเคราะห์ตามวิธี Modified Bartlett ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.6

6.8 วัดค่าความเป็นกรดด่าง

6.9 วัดค่าสี

6.10 องค์ประกอบของกรดไขมัน วิเคราะห์ตามวิธีของ Lapage และ Roy (1976) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.8

7. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลง

7.1 emulsifying capacity วิเคราะห์ตามวิธีของ Nath และคณะ (1986) ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.9

7.2 อุณหภูมิในการเกิด coagulation ดังรายละเอียดตามภาคผนวก ก.10