บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการสำรวจความชอบของเด็กวัยเรียนที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมชนิดต่าง ๆ คือ นักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และ 6 โรงเรียนสาธิตละอออุทิศ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต จำนวน 151 คน

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของขนม คือ นักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และ 6 โรงเรียนสาธิตละอออุทิศ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต จำนวนไม่น้อยกว่า 40 คน (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2545) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้กำหนดให้สุ่มตัวอย่างชั้นเรียนละไม่ต่ำกว่า 30 คน และใช้วิธีสุ่มตัวอย่างตามความสะดวก (Convenience sampling)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการพัฒนาขนมเสริมกากงาสำหรับเด็กวัยเรียน ประกอบด้วย

1. แบบสอบถามความชอบของเด็กวัยเรียนที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมชนิดต่าง ๆ ดังภาคผนวก ข
2. แบบประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนความชอบด้วยวิธี 9-Point hedonic scale ดังภาคผนวก ข

การหาปริมาณสารระเหยที่ให้กลิ่น

การเตรียมตัวอย่าง

นำกากงา 100 g บรรจุในถุงรีทอร์ทเพาซ์ (Retort pouch) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Retort) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น หลังจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน โดยนำกากงามาหาปริมาณสารระเหยที่ให้กลิ่นทุก ๆ 2 เดือน

การหาปริมาณสารระเหยที่ให้กลิ่น

การวิเคราะห์สารให้กลิ่นทำโดยใช้ Headspace-solid-phase micro extraction (HS-SPME) ร่วมกับ Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) โดยนำตัวอย่าง 5 g ใส่ใน Screw-capped amber glass vials (Supelco, Bellefonte, PA, USA) ขนาด 60 ml และนำไปสกัดสารให้กลิ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยใช้ 50/30 mm Divinylbenzene (DVB)/Carboxenon polydimethyl siloxane (PDMS) Fiber (Supelco) เป็นตัวดูดซับไอสารระเหย จากนั้นนำสารระเหยที่สกัดได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatography mass spectrometry (GC–MS, HP5972 MSD with HP5890 GC, Agilent, CA) โดยใช้คอลัมน์ VF–5MS column (60 m×0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness) ทำการปล่อยสารระเหยจากตัวดูดซับที่ช่องปล่อยสารที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิเตาอบเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ

เพิ่มขึ้นเป็น 250 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียส/นาที ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด 3 นาที โดยใช้ 1, 2-Dichlorobenzene ความเข้มข้น 130 ng/ml เป็นสารมาตรฐาน (Internal standard) โดยฉีดไปพร้อมกับตัวอย่าง และใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา (Carrier gas) ที่ความดัน 21 psi และใช้ Mass spectrometer สแกนในย่าน 29-400 m/z โดยใช้อัตราการสแกนที่ 2.05 แสกนต่อวินาที อุณหภูมิสำหรับ Mass spectrometer ion source และ Interface คือ 200 และ 260 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Apichartsrangkoon, Chaikham & Srisajjalertwaja, 2014) ตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารให้กลิ่นโดยใช้เครื่อง GC–MS โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน *n*-Alkanes (C5–C25) ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 0.1 ml การระบุชนิดของสารให้กลิ่นทำโดยเปรียบเทียบค่า Linear retention indices (LRI) กับค่าที่ได้จากฐานข้อมูลที่รู้ชนิดของสารให้กลิ่นชนิดนั้น ๆ (Adams, 2007; NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, 2005) คำนวณหาปริมาณสารให้กลิ่นจากพื้นที่ใต้กราฟ

การหาปริมาณสารอาหารในกากงา

กากงาขาว และกากงาดำที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้มาจากโรงงานผลิตน้ำมันงาในจังหวัดเชียงใหม่ กากงาที่ได้จะถูกนำมาอบแห้ง เพื่อไล่ความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความชื้น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กากใย และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2000) ดังภาคผนวก ก

การหาปริมาณกรดไขมัน

การสกัดกรดไขมันในกากงาทำตามวิธีของ Bligh และ Dyer (1959) โดยนำกากงาบด 5 g มาผสมกับ Chloroform–methanol (2:1 v/v) ที่มี BHT 10 mg/l ปริมาตร 50 ml นำสารละลายไปเก็บไว้ในตู้ดูดควัน (Fume hood) 1 คืน จากนั้นนำไปกรองโดยใช้กรวยแยก เติมน้ำเกลือปริมาตร 15 ml เขย่าตัวอย่างให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำส่วนที่อยู่ชั้นล่างไประเหย กรดไขมันที่สกัดได้จะถูกนำไป Esterified ใน Methyl esters โดยใช้วิธี Acid catalysed methylation (Yang, Sirithon & Li, 2006) นำตัวอย่างไขมันที่สกัดได้ 100 mg ผสมกับ HCl–methanol ปริมาตร 3 ml และนำไปให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง Fatty acid methyl esters ที่ได้จะถูกนำไปสกัดด้วย Hexane ปริมาตร 2 ml Fatty acid methyl esters ที่สกัดได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเครื่อง Gas chromatography (SHIMADZU รุ่น GC-2014) ใช้ดีเทคเตอร์แบบ Flame Ionization (FID) และใช้คอลัมน์ DB-Wax (30 m 0.25 mm i.d. wall-coated open tubular fused silica capillary column) ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวพาที่อัตราการไหลคงที่ 1.27 มิลลิลิตร/นาที โดยตั้งอุณหภูมิ Injector ที่ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ Detector ที่ 270 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ Oven ที่ 150-180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียส/นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2.5 องศาเซลเซียส/นาที คงไว้ 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาที คงไว้ 3 นาที และเพิ่มอุณหภูมิ

เป็น 235 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที คงไว้ 10 นาที (Thammapat, Raviyan & Siriamornpun, 2010)

การหาปริมาณเซซามีนและเซซาโมลิน

การวิเคราะห์หาปริมาณเซซามีนและเซซาโมลิน ดัดแปลงจาก Rangkadilok และคณะ (2010) นำตัวอย่างบดละเอียด 200 mg ผสมกับเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 17,500 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำไปกรองแยกส่วนของเหลวด้วยกระดาษกรอง และนำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนที่เป็นของเหลวทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน และกรองผ่าน Nylon membrane ขนาดรูกรอง 0.45 μm นำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณปริมาณเซซามีนและเซซาโมลินด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) ใช้ Reversed phase column คือ Hypersil BDS C_{18} 5 μm, 150×4 mm i.d. (Thermo Electron Co., Southend-on-Sea, UK) วิเคราะห์หาเซซามีนและเซซาโมลินด้วยโดยใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionizes water) (A) และเมทานอล (B) อัตราส่วน 80 ต่อ 20 v/v เป็นเฟสเคลื่อนที่ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตร/นาที ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 μl ตรวจวัดปริมาณเซซามีนและเซซาโมลินด้วย Diode-array detector ที่ความยาวคลื่น 290 nm รายงานผลเป็น mg/100g

การหาปริมาณแอนไซยานิดิน

นำตัวอย่าง 3 g ผสมกับเอทานอลที่ถูกปรับให้เป็นกรด (95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล และ 1.0 N HCl, 85:15 v/v) ปริมาตร 24 ml และนำไปปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 1 ด้วย 4 N HCl จากนั้นนำไปสกัดในอ่างอุ่นเขย่าได้ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ 1 ด้วย 4 N HCl นำไปสกัดต่อในอ่างอุ่นเขย่าได้ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500xg นาน 10 นาที กรองของเหลว ด้วยกระดาษกรอง และปรับปริมาตรด้วยสารสะลายเอทานอลที่ถูกปรับให้มีความเป็นกรดให้ได้ปริมาตร 50 ml (Abdel-Aal & Hucl, 1999) จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิดิน ได้แก่ ไซยานิดิน (Cyanidin) และพีโอนิดิน (Peonidin) ด้วยเครื่อง HPLC- UV detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) โดยใช้ C18 column (Waters NovaPac C18, 100x4.6 mm; Water corporation, Milford, MA, USA) ในการแยกไซยานิดินและพีโอนิดินจะใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดการวิเคราะห์ โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 0.4 เปอร์เซนต์ กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid: TFA) ในน้ำ และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ TFA ในอะซิโตไนไตรล์ (B) อัตราส่วน 18:82 มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.9 ml/min ฉีดตัวอย่างในปริมาตร 20 μl ตรวจวัดปริมาณไซยานิดินและพีโอนิดินด้วยเครื่อง UV detector ที่ความยาวคลื่น 530 nm รายงานผลเป็น mg/100g (Zhang et al., 2004; Kongkachuichai et al., 2005)

การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด วิตามินอี ศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และศักยภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ (Caco-2 cell)

การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

นำกากงา 0.2 g ผสม เอทานอล ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปสกัดด้วยความถี่สูงในเครื่อง Ultrasonic bath (Mettler Electronics Corp, Anaheim, CA, USA) นาน 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปแยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Becton Dickinson Dynac Centrifuge, Sparks, MD, USA) ที่ความเร็ว 5,600xg ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กรองแยกส่วนใสด้วยกระดาษกรอง นำกากที่เหลือสกัดซ้ำในวิธีเดิมอีก 1 ครั้ง นำของเหลวใสที่ได้ทั้ง 2 ครั้งรวมกัน ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศที่ความร้อน 45 องศาเซลเซียส

การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 0.5 ml ลงหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 8 ml เติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 ml และสารละลายอิ่มตัว Na_2CO_3 (20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที (Amarowicz et al., 2004) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan) คำนวณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค (Gallic acid) ที่ความเข้มข้น 0-800 mg/l รายงานผล mg gallic acid (GAE) equivalents/100g (mg GAE/100g)

การหาปริมาณวิตามินอี

วิเคราะห์วิตามินอีด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) โดยใช้คอลัมน์ Water Resolve C_{18} column (5 μm, 150×3.9 mm) และใช้อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) เมทานอล และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์ เมทานอล และน้ำเริ่มแรกใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 60:35:5 นาน 5 นาที และเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 60:40:0 ภายใน 3 นาที และคงที่ไว้ 2 นาที จากนั้นเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 22:78:0 ภายใน 10 นาที และคงที่ 15 นาที ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 μl ตรวจวัดวิตามินอีและอนุพันธ์ของวิตามินอีด้วย Fluorescence detector ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 298 nm และความยาวคลื่นกระจาย 328 nm รายงานผลเป็น mg/100g (Moongngarm & Saetung, 2010)

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ทำโดยปิเปตสารสกัดตัวอย่างหรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox) ปริมาตร 22 μl ลงใน 96-Well flat bottom microplate เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 150 μM ปริมาตร 200 μl ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที (Fukumoto & Mazza, 2000) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC

ผสมสารละลาย Fluorescein ความเข้มข้น 4.19 μM ที่ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 75 mM มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ปริมาตร 3 ml กับสารสกัดตัวอย่างหรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox) ความเข้มข้น 6.25-100 μmol หรือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 75 mM มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ปริมาตร 500 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น เติม 2, 2-Azobis [2-amidinopropane] Dihydrochloride (AAPH) ความเข้มข้น 153 mM ปริมาตร 0.5 ml และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 493 nm และความยาวคลื่นกระจาย 515 nm (Huang et al., 2002) โดยใช้ Spectrofluorometer (Perkin-Elmer LS 55 luminescence spectrofluorometer, Perkin Elmer,Waltham, MA, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาค่า ORAC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox รายงานผลเป็น μmol Trolox equivalents/100g (μmol TE/100g)

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ดัดแปลงจาก Griffin และ Bhagooli (2004) โดยนำสารสกัดตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานของ Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) ปริมาตร 20 μl ผสมกับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 150 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาค่า FRAP รายงานผลเป็น μmol Trolox equivalents/100g (μmol TE/100g)

การหาศักยภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ (Caco-2 cell)

เซลล์ลำไส้ (Caco-2)

เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco-2 cell, passages number 30-40) (ATCC, Rockville, MD, USA) ถูกเลี้ยงใน 6 Well plate ความเข้มข้น $4x10^4$ เซลล์/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนไม่จำเป็นความเข้มข้น, 1 เปอร์เซ็นต์ กรดอะมิโนแอล-กลูตามีน (L-glutamine), 0.2 เปอร์เซ็นต์ ยาฆ่าเชื้อรา (Fungizone) และ 1 เปอร์เซ็นต์ ยาปฏิชีวนะ (penicillin-streptomycin) โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ประมาณ 4-5 วัน จะลดความเข้มข้นของ Heat inactivated fetal bovine serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานให้เหลือ 7.5 % v/v และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน เซลล์ที่นำไปใช้ในการศึกษาจะเป็นเซลล์ที่มีอายุ 11-14 วัน หลังเจริญเต็มที่ (Garrett et al., 1999)

การทดสอบความเป็นพิษของกากงา

นำเซลล์มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสมสารสกัดจากกากงาความเข้มข้น 5, 10 และ 20 mg/ml นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบ

กำหนดเวลาจึงล้างเซลล์ด้วย Cold PBS และเติม Cold PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม จากนั้นเติม 50 เปอร์เซ็นต์ Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม นำเซลล์ไปแช่ในตู้ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ผึ่งให้แห้ง ย้อมเซลล์ด้วยสี SRB นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย Acetic acid เข้มข้นร้อยละ 1 ผึ่งให้แห้ง ละลายสีที่ใช้ย้อมโปรตีนในเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris [hydroxymethyl] aminomethane buffer ปริมาตร 2 ml ต่อหลุม เขย่า 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm การคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์โดยเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่นำไปศึกษาต้องเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Houghton et al., 2007 และ Dawilai et al., 2013)

การป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ (Caco-2)

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสมสารสกัดกากงาที่ความเข้มข้น 5, 10 หรือ 20 mg/ml นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO_2 ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน และนำเซลล์ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสม H_2O_2 ความเข้มข้น 1 mM ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน และนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณ IL-8 ด้วยวิธี ELISA (Katayama & Mine, 2007) และนำเซลล์ไปหา Reactive oxygen species (ROS) ด้วยวิธี 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Mekhora et al., 2012) รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้าง ROS และการหลั่ง IL-8

การพัฒนาขนมจากกากงา

การสำรวจความชอบของเด็กวัยเรียนที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมชนิดต่าง ๆ

การพัฒนาขนมจากกากงาสำหรับเด็กวัยเรียนทำโดยการใช้แบบสอบถาม ดังภาคผนวก ข ซึ่งข้อมูลในแบบสอบถามประกอบด้วย ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม และความชอบของเด็กวัยเรียนที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แพนเค้ก ขาไก่ วอฟเฟิล ข้าวเกรียบ ขนมปังปอนด์ และคุกกี้ โดยให้นักเรียนชั้นประถมศึกษาปีที่ 5 และ 6 โรงเรียนสาธิตละอออุทิศ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เป็นผู้ตอบแบบสอบถามโดยจัดลำดับความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ขนม (1 ชอบมากที่สุด ถึง 6 ชอบน้อยที่สุด)

การคัดเลือกตำรับพื้นฐานของผลิตภัณฑ์ขนม

ขนมที่ผู้ตอบแบบสอบถามชอบมากที่สุดจะถูกนำมาหาตำรับพื้นฐาน โดยตำรับพื้นฐานจะคัดเลือกมาจาก 3 ตำรับ จากนั้นจึงนำตำรับพื้นฐานที่ได้ทั้ง 3 ตำรับ มาทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ 9-Point hedonic scale (1 ไม่ชอบมากที่สุด ถึง 9 ชอบมากที่สุด) ดังภาคผนวก ข โดยผู้ตอบแบบสอบถาม คือ เด็กนักเรียนชั้นประถมศึกษาที่ 5 และ 6 ที่ไม่ผ่านการฝึกฝนอย่างน้อย

ชั้นเรียนละไม่ต่ำกว่า 30 คน ตำรับพื้นฐานที่ผู้บริโภคให้การยอมรับมากที่สุดจะถูกนำมาพัฒนาเป็นขนมเสริมกากงา

การพัฒนาขนมเสริมกากงาสำหรับเด็กวัยเรียน

ตำรับพื้นฐานที่ผ่านการคัดเลือกจะถูกนำมาพัฒนาเป็นขนมเสริมกากงาสำหรับเด็กวัยเรียน โดยเสริมกากงาดำ 20, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ของส่วนผสมหลัก ในตำรับพื้นฐานจากนั้นนำขนมเสริมกากงาที่ได้ไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับการหาตำรับพื้นฐาน

การทดสอบทางกายภาพ

ผลิตภัณฑ์ขนมตำรับพื้นฐาน และขนมเสริมกากงาที่ได้ จะถูกนำมาวัดเนื้อสัมผัสใช้เครื่องมือ Texture analyzer และวัดค่าสีด้วยเครื่อง Handy colorimeter NR-3000, Japan

การหาปริมาณโพลีฟีนอล คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และศักยภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ Caco-2 cell

ขนมเสริมกากงาที่พัฒนาได้จะถูกนำมาผ่านกระบวนการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอล คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และศักยภาพในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ Caco-2 cell นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากขนมเสริมกากงาที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อย

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างขนมเสริมกากงาที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อย

การเตรียมสารสกัดขนมเสริมกากงาที่ไม่ผ่านการย่อยทำโดยนำขนมเสริมกากงา 1 g ผสมเอทานอล ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปสกัดตามวิธีข้างต้น

การเตรียมสารสกัดขนมเสริมกากงาที่ผ่านการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร

นำตัวอย่างขนมบดละเอียด 1 g ผสมกับ NaCl ความเข้มข้น 120 mM ปริมาตร 30 ml จากนั้นนำไปปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายตัวอย่างด้วย HCl ความเข้มข้น 1 mM เพื่อให้ได้ pH 2.0 จากนั้นเติมเปปซิน 2 ml นำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.3 ด้วย $NaHCO_3$ ความเข้มข้น 0.9 M เติมสารละลายผสมของสารสกัดน้ำดี (Bile extract) และแพนครีเอติน (Pancreatin) ปริมาตร 9 ml ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 mol/l จากนั้นนำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ของเหลวที่ผ่านการกรองจะเรียกว่า Micellarized fraction (Ferruzzi et al., 2006 และ Dawilai et al., 2013)

การหาปริมาณโพลีฟีนอลและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดจากขนมเสริมกากงาทั้งที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อยและผ่านการจะลองการย่อยจะถูกนำมาหาปริมาณโพลีฟีนอล และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ตามวิธีข้างต้น โดยปริมาณโพลีฟีนอลรายงานผลเป็น mg GAE/g การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ และ μmol TE/g ตามลำดับ

การป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ (Caco-2) ของผลิตภัณฑ์ขนมเสริมกากงา

การทดสอบการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ลำไส้ (Caco-2) ของผลิตภัณฑ์ขนมเสริมกากงา ทำโดยนำเซลล์ Caco-2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสมสารสกัดจากขนมเสริมกากงาที่ไม่ผ่านการย่อยที่ความเข้มข้น 5, 10 หรือ 20 mg/ml หรือผสมสารสกัดจากขนมเสริมกากงาที่ผ่านการย่อย (Micellarized fraction) ความเข้มข้น 5 mg/ml โดยใช้ความเข้มข้นนั้นความเข้มข้นเดียว เนื่องจากเป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยจึงใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการย่อยจริง ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของตัวอย่าง 5 mg/ml จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO_2 ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม H_2O_2 ความเข้มข้น 1 mM นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณ IL-8 ที่เซลล์หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA (Katayama & Mine, 2007) โดยรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง IL-8

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

ผลิตภัณฑ์ขนมเสริมกากงาที่ผู้บริโภคให้การยอมรับมากที่สุดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความชื้น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2000)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำการทดลอง โดยใช้ One way ANOVA ในการวิเคราะห์ความแปรปรวน และใช้ Duncan multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากตัวอย่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ T-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากตัวอย่าง 2 กลุ่ม ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS ข้อมูลทั้งหมดรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย$\pm$ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean$\pm$SD)