บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

เปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง (*Durio zibethinus* Murry) จากร้านผลิตทุเรียนทอดในตลาดขายผลไม้ เทศบาลตำบลเนินสูง อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

3.2 เครื่องมือ

3.2.1 ตู้อบลมร้อน (hot air oven); ECOCELL707

3.2.2 เครื่องปั่น (blender); 32BL79

3.2.3 เครื่องวัดปริมาตร ได้แก่

3.2.3.1 ปิเปตต์ (pipette)

3.2.3.2 ไมโครปิเปต (micropipette)

3.2.3.3 กระบอกตวง (cylinder)

3.2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) ; MS 1602S

3.2.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ; (Z 206 A) HERMLE

3.2.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ; Grant

3.2.7 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) ; SPEKOL 1300SA

3.2.8 เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary eveporator) ; BUCHI

3.2.9 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ; HVE 50

3.2.10 เตาให้ความร้อน (hot plate) ; Rommelsbacher

3.2.11 เครื่องแก้ว ได้แก่

3.2.11.1 ฟลาสก์ (flask)

3.2.11.2 หลอดทดลอง (test tube)

3.2.11.3 กรวยแก้ว (funnel)

3.2.11.4 บีกเกอร์ (beaker)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.11.5 แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)

3.2.11.6 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)

3.2.11.7 ขวดแก้ว (glass bottle)

3.2.11.8 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2.11.9 ขวดก้นกลม (round bottom flasks)

3.2.11.10 คิวเวตต์แก้ว (glass cuvette)

3.2.12 หลอดเซนทริฟิวจ์พลาสติก (centrifuge Tube); Polylab

3.2.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH metter); S20-K

3.2.14 เครื่องเขย่าสาร (shaker); HZQ-20A ORBIT: 20 mm

3.2.15 ตู้ดูดควันสารเคมี (ductless fume hood); SPD-3A1

3.2.16 ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump); SA55JXHTP-4698

3.3 สารเคมี

3.2.1 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4)

3.2.2 กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5 - dinitrosalicylic acid, $C_7H_{14}N_2O_7$)

3.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)

3.2.4 ฟีนอล (phenol, C_6H_5OH)

3.2.5 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate, $KNaC_4H_4O_6$)

3.2.6 ซิลิกาเจล (silica Gel)

3.2.7 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $Ca(OH)_2$

3.2.8 ถ่านกัมมันต์ (activated carbon)

3.2.9 น้ำตาลกลูโคส (glucose)

3.2.10 น้ำตาลมอลโตส (maltose)

3.4 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมวัตถุดิบ ดัดแปลงจากวิธีการของ Unhasirikul และคณะ (2013)

นำเปลือกทุเรียนมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 1-2 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักสด นำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ บรรจุใส่ถุงพลาสติกแบบซิปล็อคและเก็บไว้ในกล่องที่มีซิลิกาเจล เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การปรับสภาพ ดัดแปลงจากวิธีการของสุจิตตรา ตั้งประกอบเจริญ (2549)

ชั่งตัวอย่าง 600 กรัม นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้สารละลายท่วมตัวอย่าง จากนั้นกรองแยกสารละลายทิ้งและล้างตะกอนตัวอย่างจนน้ำล้างตะกอนเป็นกลาง (pH=7) อบให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้น นำตัวอย่างที่ได้มาบดด้วยเครื่องปั่น (Blender) ให้เป็นผงละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 600 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ จ.นครราชสีมา

3.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกทุเรียน

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ จ. นครราชสีมา

3.4.4 การไฮโดรไลซิส ดัดแปลงจากวิธีการของ Unhasirikul และคณะ (2013)

นำตัวอย่างเปลือกทุเรียนที่ไม่ได้ปรับสภาพและปรับสภาพ ปริมาณ 40 กรัม มาใส่ฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร หรือสัดส่วนของเปลือกทุเรียนต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1:10 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปไฮโดรไลซิสในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15, 30, 45, และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำมากรองและนำไฮโดรไลเสทที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เพื่อปรับสภาวะให้เป็นกลาง วัดปริมาตรส่วนที่เป็นของเหลว แล้วนำส่วนที่เป็นของแข็งไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซิส (%Acid hydrolysis efficiency; %AHE) และผลผลิตร้อยละ (%yield) ดังสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และส่วนที่เป็นของเหลวนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS (Bernfeld, 1955) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธีการทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hansen and Phillips, 1981)

$$\%\ \text{AHE} = \frac{\text{ปริมาณของแข็งก่อนการไฮโดรไลซิส} - \text{ปริมาณของแข็งหลังการไฮโดรไลซิส}}{\text{ปริมาณของแข็งก่อนการไฮโดรไลซิส}} \times 100$$

สมการที่ 1

$$\%\ \text{Yield} = \frac{\text{ปริมาตรของเหลวภายหลังการย่อย}}{\text{ปริมาตรของเหลวก่อนการย่อย}} \times 100$$

สมการที่ 2

3.4.5 ศึกษาผลของการลดปริมาณสารพิษในไฮโดรไลเสทต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด

1) การลดปริมาณสารพิษด้วยวิธีโอเวอร์ไลมิง ดัดแปลงจากวิธีการของ หรรษา เวียงวะลัย (2548)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

นำไฮโดรไลเสทที่ได้จากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับพีเอช ให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นปรับพีเอช ให้เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 13 โมลาร์ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนทริฟิวส์ ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของไฮโดรไลเสทที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2) การลดปริมาณสารพิษด้วยวิธีการระเหยแบบสุญญากาศ ดัดแปลงจากวิธีการของ หรรษา เวียงวะลัย (2548)

นำไฮโดรไลเสทจากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับพีเอช ให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากนั้นปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 ด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 13 โมลาร์ แล้วใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ระเหยสารละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เหลือสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลเสทปริมาตรประมาณ 35 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสของไฮโดรไลเสทที่ได้ ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

3) การลดปริมาณสารพิษโดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ ดัดแปลงจากวิธีการของ ดรุณวรรณ ชื่นบุบผา (2553)

นำไฮโดรไลเสทจากการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมถ่านกัมมันต์ลงในสารละลาย โดยใช้ถ่านกัมมันต์ต่อไฮโดรไลเสทอัตราส่วน 1:10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง ให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ และนำส่วนใสของไฮโดรไลเสทที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

3.4.6 สถิติที่ใช้ในการทดลอง

งานวิจัยนี้วางแผนการทดลองแบบ 4^2 แฟคทอเรียล ประกอบด้วย 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไฮโดรไลซิส ได้แก่ ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสในหม้อนึ่งความดันไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ในแต่ละการทดลองได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รวมทั้งหมด 48 ทรีทเมนต์ และนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย วิธี Duncun’s new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS (Trial version) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี