

บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุประสงค์

ใช้ส่วนแอลบิโดของส้มโอ (*Citrus grandis* Linn.) 5 พันธุ์ โดยที่แต่ละพันธุ์มีอายุเท่า กันคือ 8 เดือน พันธุ์ของส้มโอและแหล่งที่เก็บแสดงได้ดังนี้

<u>พันธุ์ส้มโอ</u>	<u>สถานที่เก็บ</u>
ขาวบ้าน	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
ขาวพวง	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
ขาวจีบ	อ.เมือง จ.นนทบุรี
ทองดี	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
ขุนนนท์	อ.เมือง จ.นนทบุรี

ขั้นตอนการทดลอง

การทดลองแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

- 3.1 วิเคราะห์ปริมาณและสมบัติของเพคติน ในแอลบิโดส้มโอพันธุ์ต่างๆ
 - 3.2 ศึกษาผลของการใช้โซเดียมเฮกซาเมตาฟอสเฟต (เอสเอชเอ็มพี) และเอทิลีนไดเอมีนเทตราอะซิติกแอซิก (อีดีทีเอ) ร่วมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกในการสกัดเพคตินที่ pH ระดับต่าง ๆ
 - 3.3 ศึกษาผลของอัตราส่วนน้ำหนักแอลบิโดสดต่อปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ในการสกัดเพคติน
 - 3.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดเพคติน
 - 3.5 รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้
-
- 3.1 วิเคราะห์ปริมาณและสมบัติของเพคติน ในแอลบิโดส้มโอพันธุ์ต่าง ๆ
 - 3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ
 - 3.1.1.1 นำผลส้มโอ 5 พันธุ์ได้แก่พันธุ์ ขุนนนท์ ขาวจีบ ขาวบ้าน ขาวพวง

และทองคำ มาปอกเปลือกแยกส่วนผิวออกจากเปลือกจนเหลือแต่ส่วนแอลบิโด

3.1.1.2 นำส่วนแอลบิโดดังกล่าวมาตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหาร (Dynamics Cooperation of America, U.S.A., Model 32 BL 79) จนมีขนาดของชิ้นแอลบิโดหนา ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร)

3.1.1.3 นำแอลบิโดที่ตีปั่นแล้วมาต้มในเอธานอล (Commercial grade กรมสรรพสามิต) ความเข้มข้นร้อยละ 95 (โดยใส่เอธานอลปริมาตรหนึ่งเท่าของน้ำหนักแอลบิโดสด) จนเดือดเป็นเวลา 15 นาที เพื่อขยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

3.1.1.4 แยกแอลบิโดออกจากเอธานอลแล้วล้างแอลบิโดด้วยเอธานอล (commercial grade) ความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตรหนึ่งเท่าของน้ำหนักแอลบิโดสดสาม ครั้ง เพื่อกำจัดน้ำตาลและกรดอินทรีย์ออกจากแอลบิโด

3.1.1.5 บีบเอาเอธานอลออกจากแอลบิโดจนหมด นำแอลบิโดทั้งหมด เก็บในภาชนะที่แห้ง แล้วนำไปแช่แข็ง เพื่อเก็บไว้ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดเพคตินต่อไป

3.1.2 การสกัด Total crude pectin

3.1.2.1 นำแอลบิโดที่ได้จากข้อ 3.1.1.5 วิเคราะห์หาความชื้นตามวิธีของ Rangana (11)

3.1.2.2 สกัด Total crude pectin โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rangana (11) Pathak และ Shukla (25) และนัยทัตน์ (26) ดังนี้

นำแอลบิโดที่ได้จากข้อ 3.1.1.5 100 กรัม มาเติมน้ำกลั่น

ให้มีอัตราส่วนของน้ำหนักแอลบิโดสดต่อปริมาตรน้ำกลั่น = 1:4

ปรับ pH=2.00 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (A.R., Merck)

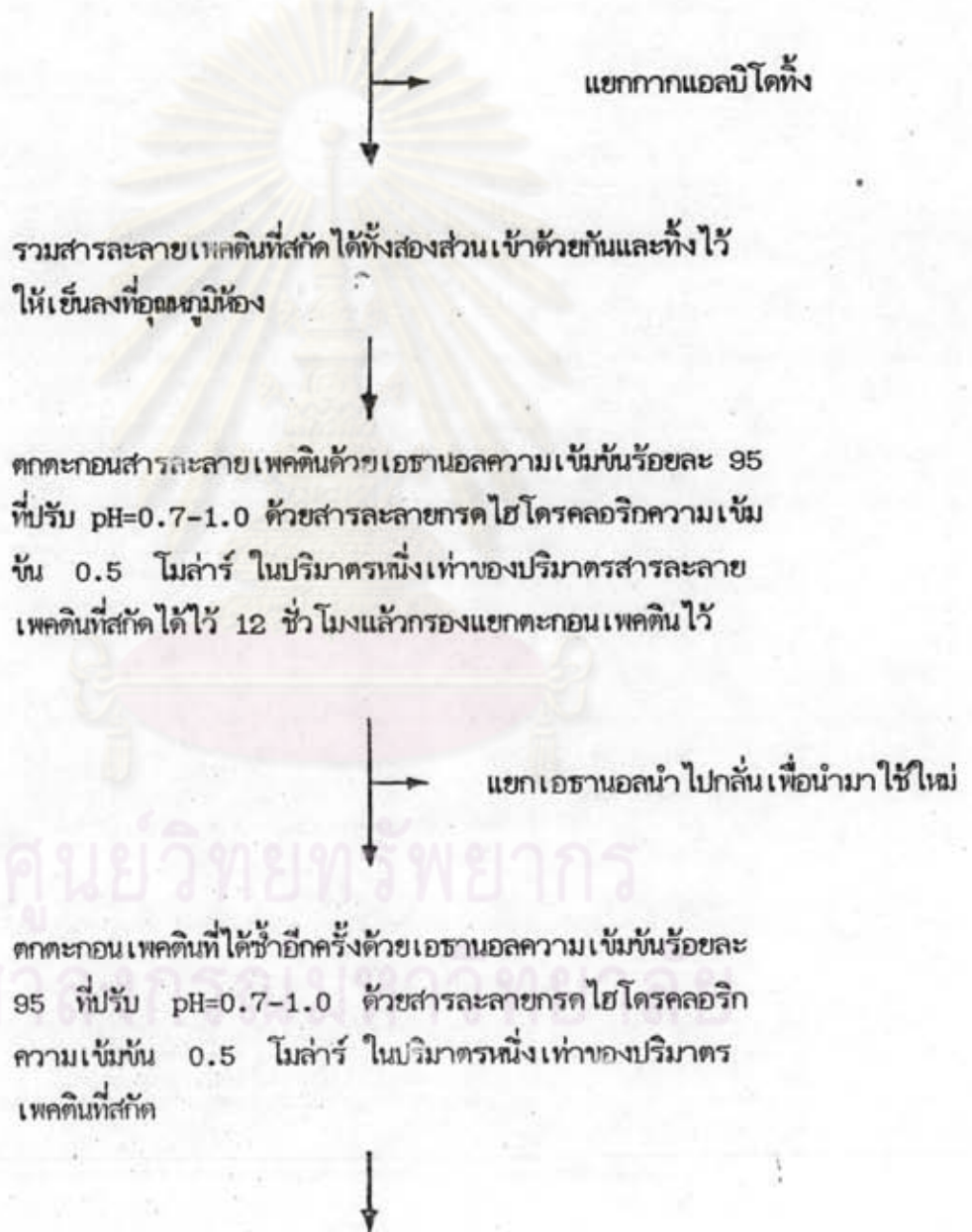
ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์โดยใช้ pH meter (Orion research, Model 610 I Digital Ionalyzer)

↓

สกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที กรองแยกสารละลายที่สกัดได้ไว้

↓

เติมน้ำกลั่นลงในส่วนกากแอลมิโตที่เหลือ โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1/4 ของปริมาตรที่ใช้สกัดครั้งแรกปรับ pH=2.00 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ โดยใช้ pH meter



ล้างตะกอนเพคตินด้วยเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่ปรับ
pH=0.7-1.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น
0.5 โมลาร์ ทำการล้างเช่นนี้ 3 ครั้ง



ล้างตะกอนเพคตินด้วยเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 จน
หมดอนุโมลคลอไรด์ (Cl^-)



อบแห้งตะกอนเพคตินที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบลมร้อน
(Science Instrument, SC 1086, Thailand) จนน้ำหนักเพคตินที่ได้คงที่



บดเป็นผงแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely randomized design (27)
ทดลอง 2 ซ้ำ

3.1.3 วิเคราะห์และประเมินผล สมบัติทางเคมีและกายภาพดังนี้

3.1.3.1 ปริมาณเพคตินสกัดที่ปราศจากเถ้าและความชื้น โดยน้ำหนักแอลบีโด
แห้ง (ภาคผนวก ก)

3.1.3.2 ปริมาณเพคตินสกัดบริสุทธิ์ โดยน้ำหนักแอลบีโดแห้ง (ภาคผนวก ก)

3.1.3.3 ปริมาณความชื้นตามวิธีของ Joslyn (3) (ภาคผนวก ก)

3.1.3.4 ปริมาณเถ้าตามวิธีของ Rangana (11) (ภาคผนวก ก)

3.1.3.5 Equivalent weight (Eq.wt.) ตามวิธีของ Joslyn (3)
(ภาคผนวก ก)

3.1.3.6 ปริมาณ Methoxyl content (MeO.) ตามวิธีของ Joslyn (3)
(ภาคผนวก ก)

3.1.3.7 ปริมาณ Anhydrouronic acid (A.U.A.) ตามวิธีของ Rangana (11) (ภาคผนวก ก)

3.2 ศึกษาผลของการใช้เอสเอชเอ็มพี และอัลทีเอร่วมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ในการสกัดเพคตินที่ pH ระดับต่าง ๆ

เลือกส่วนแอลบิโดของส้มโอตามพันธุ์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 โดยใช้เกณฑ์การเลือกเรียงลำดับตามความสำคัญดังนี้

1 มีปริมาณเพคตินบริสุทธิ์สูง โดยประเมินจากปริมาณเพคตินสกัดที่ปราศจากแก้วและความชื้นร่วมกับปริมาณ A.U.A.

2 มี Eq.Wt. และปริมาณ MeO. สูง

3.2.1 การใช้เอสเอชเอ็มพีในการสกัดเพคติน

3.2.1.1 นำส่วนแอลบิโดส้มโอพันธุ์ที่เลือกได้มาเตรียมดังข้อ 3.1.1 เพื่อใช้ในการสกัดเพคติน

3.2.1.2 เติมเอสเอชเอ็มพี (A.R., Merck) ปริมาณ 0%-5.0% (โดยน้ำหนักแอลบิโดสด) ลงในสารละลายสกัดทำ 4 ระดับ และปรับ pH ในช่วงระหว่าง 2.00-5.00 โดยใช้ pH meter ทำ 4 ระดับ สกัดเพคตินตามขั้นตอนข้อ 3:1.2 โดยวางแผนการทดลองแบบ Symmetry factorial completely randomized design (27) ขนาด 4^2 ทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.1.3 วิเคราะห์และประเมินผลตามข้อ 3.1.3 พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่า Jelly grade ตามวิธีของ U.S.Department of Agriculture (6) โดยเปรียบเทียบความแข็งของ acid sugarjelly ที่เตรียมได้กับเพคตินมาตรฐาน (Food grade, Genu pectin grade 150) ด้วยเครื่อง Texturometer (Loyd Instruments, Type No.PL3 ser No.4902, England)

3.2.2 การใช้อัลทีเอในการสกัดเพคติน

3.2.2.1 นำส่วนแอลบิโดส้มโอพันธุ์ที่เลือกได้มาเตรียมดังข้อ 3.1.1 เพื่อใช้ในการสกัดเพคติน

3.2.2.2 เติมอัลทีเอ (A.R., Merck) 0%-3.0% (โดยน้ำหนักแอลบิโดสด) ลงในสารละลายสกัด ทำ 4 ระดับ และปรับ pH ในช่วงระหว่าง 2.00-5.00 โดยใช้ pH meter ทำ 4 ระดับสกัดเพคตินตามขั้นตอนข้อ 3.1.2 โดยวางแผนการทดลองแบบ Symmetric

factorial completely randomized design (27) ขนาด 4^2 ทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2.3 วิเคราะห์และประเมินผลตามข้อ 3.1.3 พร้อมทั้งวิเคราะห์หาค่า Jelly grade ตามวิธีของ U.S. Department of Agriculture (6) โดยเปรียบเทียบความแข็งของ acid sugar jelly ที่เตรียมได้กับเพคตินมาตรฐานด้วยเครื่อง Texturometer

3.3 ศึกษาผลของอัตราส่วนน้ำหนักแอลบิโดสต่อปริมาณสารละลายกรด ที่ใช้ในการสกัดเพคติน เลือกสารเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 โดยใช้เกณฑ์การเลือกเรียงลำดับตามความสำคัญดังนี้

- 1 มีปริมาณเพคตินบริสุทธิ์สูง โดยประเมินจากปริมาณเพคตินสกัดที่ปราศจากแก้วและความชื้น ร่วมกับ ปริมาณ A.U.A.
- 2 มี Eq.Wt. และปริมาณ MeO. สูง
- 3 มีค่า Jelly grade สูง

3.3.1 นำผลการเลือกใช้สารเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและ pH ที่เหมาะสม มาใช้ในการสกัดเพคตินตามขั้นตอนข้อ 3.1.2 โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักแอลบิโดสต่อปริมาณสารละลายกรดที่ใช้ 3 ระดับคือ 1:3 1:4 และ 1:5 วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely randomized design (27) ทดลอง 2 ซ้ำ

3.3.2 วิเคราะห์และประเมินผลเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.3

3.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดเพคติน

3.4.1 เลือกอัตราส่วนของน้ำหนักแอลบิโดสต่อปริมาณสารละลายกรดที่ใช้สกัดที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 โดยใช้เกณฑ์การเลือกเช่นเดียวกับข้อ 3.3

3.4.2 สกัดเพคตินตามขั้นตอนข้อ 3.1.2 ที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและที่เวลา 3 ระดับคือ 30 60 และ 90 นาที วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Asymmetric completely randomized design (27) ขนาด 2×3 ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.3 วิเคราะห์และประเมินผลเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.3

3.5 รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้