

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### 3.1.1 วัสดุ

ผงพันธุกรรมสาลี ส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินในแต่ละช่วงอายุการเจริญเติบโต มาจากสวนคุณวีรวัฒน์ วิจิฉัย อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่

ส่วนที่ใช้หากระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดเพคติน ซื้อมาจากตลาดเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

##### 3.1.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta camera : Model CR300)
- เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer : Model TAXT2i )
- เครื่องวัดความหนืด (Viscometer, Brookfield : Model DV-II+)
- เครื่องวัดความหนืด (Cannon<sup>®</sup> Rotary Viscometers : Model LV - 2000F series II)

##### 3.1.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี

- ตู้อบความชื้น
- เครื่องวัดค่า Aw (Novasina : Model AWC 200)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV / Visible Spectrophotometer, Jasco : Model V-530)

### 3.1.4 อุปกรณ์สำหรับการทดลองหากระบวนการสกัดเพคตินที่เหมาะสม

- เทอร์โมมิเตอร์
- เครื่องแก้ว
- แ่งแก้วคน
- เครื่องกรองสุญญากาศ (Super Suction Unit : model SS 200B-89A1283)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Mettler- Toledo : Model BB 120)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Sartorius : Model B3100P)
- ตู้อบแห้งแบบลมร้อน
- ตู้อบ
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge Kubota : Model 5100)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High Refrigerated Speed Centrifuge : Model UNICEN 15DR)
- เครื่องวัดค่าของแข็งที่ละลายได้ (Hand Refractometer, Atago : Model N2 Brix 32 – 68 %)
- กระจกนาฬิกา
- เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer, Labinco : Model L344)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Heto<sup>®</sup> : Model CBN 18 - 50)
- เครื่องแยคน้ำและเนื้อผลไม้ (Compact Juicer, National : MJ - 68 M)
- เครื่องปั่นผสมอาหาร (Blender, National : Model MXT-31 GN No. 940823)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Accumet<sup>®</sup> : Model 15)
- ถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน ขนาด 10 X 14 นิ้ว
- นาฬิกาจับเวลา
- ออโตปิเปต ขนาด 10 – 100 และ 200 – 1,000 ไมโครลิตร (Autopipette, Varipette<sup>®</sup> 4810, Eppendorf : Model No. 181182)

### 3.1.5 สารเคมี

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ( Sodium Hydroxide ; NaOH : Merck)
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid ; HCl : Merck)
- โซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต (Sodium hexametaphosphate ; SHMP : Merck)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride ; NaCl : Merck)
- แอมโมเนียมออกซาลेट (Ammonium oxalate ;  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  : Merck)
- กรดกาแลคติกวโรนิก (D-Galacturonic acid monohydrate ;  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  : Merck)
- เมธิลเรด (Methyl red Indicator ;  $(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{N}$  : May & Baker)
- ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein ;  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$  : Merck)
- กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  : Merck)
- คาบาโซล (Cabazole ;  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}$  : Fluka)
- กรดซิตริก (Citric acid : Food Grade)
- เพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลสูง (Citrus pectin ; Lot 98H0650 : Sigma)
- เพคตินที่มีหมู่เมธอกซิลต่ำ (Citrus pectin ; Lot 96H0580 : Sigma)

### 3.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.1 การหาปริมาณเพคตินในฝรั่งของแต่ละช่วงอายุของการเจริญเติบโต

นำฝรั่งที่มีอายุ 60, 90, 120, 150 และ 165 วันหลังการออกดอกมาหาปริมาณเพคตินตามวิธีการของ IFJU (International Federation of Fruit Juice Producer, 1964) โดยทำการหาปริมาณของเพคตินทั้งหมด เพคตินที่ละลายได้ในน้ำ เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาลेट และเพคตินที่ละลายได้ในด่าง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำฝรั่งมาทำการล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเพื่อสะดวกในการนำไปแยกน้ำและเนื้อฝรั่งด้วยเครื่องแยกน้ำผลไม้ เก็บน้ำและนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินตามวิธีการของ IFJU

### 3.2.2 ศึกษาการเตรียมวัตถุดิบก่อนนำมาสกัดเพคติน

#### การเตรียมวัตถุดิบ

หาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพคตินเนส โดยกำหนดปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิ                      ศึกษาที่ 60, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 เวลา                              ศึกษาที่ 5 และ 10 นาที

แล้วทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพคตินเนสด้วยวิธีการของ Ranganna (1986) โดยวางแผนการทดลองแบบ 3 X 2 Factorial experiment design ที่ประกอบด้วย 2 ปัจจัยข้างต้น

### 3.2.3 ศึกษากรรมวิธีการสกัด

การเตรียมวัตถุดิบ ในการทดลองนี้จะใช้กากฝรั่งที่ได้จากทำน้ำฝรั่ง นำมาล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง เพื่อขจัดสิ่งแปลกปลอมที่ติดมา เช่น สี แป้ง น้ำตาล และอื่นๆ โดยใช้อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อน้ำประปาเป็น 1 : 2 น้ำหนักโดยปริมาตร จากนั้นกรองเอากากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง ลวกกากฝรั่งเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพคตินเนส กรองเอากากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

#### 3.2.3.1 หาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้เป็นสารสกัด

กำหนดความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก คือ 0.02, 0.05, 0.10, 0.15, และ 0.20 นอร์มอล แล้ววัดปริมาณเพคติน ด้วยวิธีการของ Rangana (1986) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

กรรมวิธีการสกัด (Rangana, 1986) นำกากฝรั่ง 100 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริก 0.02 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วน 1 : 2 โดยน้ำหนักโดยปริมาตร (กาก : กรดเกลือ) นำไปสกัดในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกกากด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ขณะยังร้อนอยู่ ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนที่จะทำการตกตะกอน

**กรรมวิธีการตกตะกอน** นำสารละลายเพคตินที่กรองได้มาตกตะกอนด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก 0.05 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วน 1 : 2 โดยปริมาตร (สารละลายเพคติน : เอธิลแอลกอฮอล์) จะเกิดตะกอนเพคติน เป็นวุ้นสีขาวลอยอยู่ด้านบนจำนวนมาก ทั้งไข้ข้ามคืนเพื่อให้ตะกอนเพคตินรวมตัวกันได้ดีและเพื่อให้ง่ายต่อการแยกตะกอน เมื่อครบเวลาดำหนด กรองตะกอนเพคตินด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

#### **วิธีทดสอบอนุโมลคลอไรด์ของตะกอนเพคติน**

ตวงสารละลายแอลกอฮอล์ที่ใช้ล้างตะกอนครั้งสุดท้ายใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 5 % ประมาณ 8 – 10 หยด แล้วจึงหยดสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 2 หยด หากตะกอนเพคตินไม่มีอนุโมลคลอไรด์จะเกิดสีส้ม

นำตะกอนเพคตินที่กรองได้ นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทั้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาปริมาณเพคตินที่สกัด (Rangana, 1986) ทำการสกัดเช่นเดิมแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเป็น 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 นอร์มอล ตามลำดับ

#### **3.2.3.2 หาอัตราส่วนของกรดต่อปริมาณวัตถุดิบที่ใช้สกัด**

จากความเข้มข้นของกรดที่เหมาะสมในข้อ 3.2.3.1 ทำการศึกษาอัตราส่วนของกรดต่อปริมาณวัตถุดิบที่ใช้สกัด อัตราส่วนที่ศึกษา คือ 1 : 1, 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, 5 : 1, 6 : 1 และ 7 : 1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้วิธีการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1

#### **3.2.3.3 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัด**

อุณหภูมิในการสกัดที่ศึกษาคือ 60, 80 และ 98 องศาเซลเซียส โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และใช้วิธีการสกัดการสกัดเหมือนกับข้อ 3.2.3.1 โดยใช้ภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.2.3.2

### 3.2.3.4 หาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเพคติน

กำหนดปัจจัยของเวลาที่ศึกษาคือ 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยใช้ภาวะที่ดีที่สุดที่สุดจากข้อ 3.2.3.3

### 3.2.3.5 ศึกษาจำนวนครั้งของการสกัด

จำนวนรอบที่การสกัดได้แก่ 1 ครั้ง 2 ครั้ง 3 ครั้ง และ 4 ครั้ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3.4

### 3.2.3.6 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างสารละลายกรดเพคติกต่อปริมาณสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ในการตกตะกอน

อัตราส่วนสารละลายกรดเพคติกต่อปริมาณสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้ศึกษาคือ 1 : 1, 1 : 1.5, 1 : 2, 1 : 2.5 และ 1 : 3 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดเพคติน โดยใช้ภาวะที่ดีที่สุดที่สุดจากข้อ 3.2.3.5 นำสารละลายเพคติน แบ่งใส่บีกเกอร์ ๆ ละ 20 มิลลิลิตร ตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 % ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก 0.05 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วนของสารละลายเพคตินต่อ แอลกอฮอล์ตามที่ได้วางแผนการทดลองไว้ ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ทำการกรองแยกเอาตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำตะกอนเพคตินไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาปริมาณเพคติน



### 3.2.3.7 ศึกษาการใช้สารโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตในการสกัดเพคติน

กำหนดปริมาณสารโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตที่ใช้ คือ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักวัตถุดิบ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้ภาวะที่ดีที่สุดจากข้อ 3.2.3.5 และ 3.2.3.6 แต่เพิ่มสารโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟตลงไปเพื่อช่วยในการสกัด

### 3.2.4 หาสสมบัติทางเคมีและกายภาพของเพคตินที่สกัดได้ดังนี้

3.2.4.1 ปริมาณความชื้น (%) (AOAC, 1998)

3.2.4.2 ปริมาณเถ้า (%) (AOAC, 1998)

3.2.4.3 ค่า  $a_w$  ใช้เครื่องวัดค่า  $a_w$  (Novasina : Model RS - 302)

3.2.4.4 Equivalent weight (%) (Rangana, 1986)

3.2.4.5 Degree of esterification (%) (Rangana, 1986)

3.2.4.6 Acidic uronic acid (Rangana, 1986)

3.2.4.7 Total anhydrouronic acid (Rangana, 1986)

3.2.4.8 Jelly grade (Rangana, 1986)

3.2.4.9 Jelly unit (Rangana, 1986)

3.2.4.10 อัตราการเกิดเจล (Rangana, 1986)

3.2.4.11 Gel Strength โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer : Model TAXT2i)

3.2.4.12 สีของเจล โดยใช้เครื่องวัดสี (Minolta Camera : Model CR300)

3.2.4.13 ความหนืด โดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Digital Viscometer : Model DVII+) และเครื่องวัดความหนืด (Cannon<sup>®</sup> Rotary Viscometers : Model LV - 2000F series II)

### 3.2.5 หาอายุการเก็บรักษาจากฝรั่งอบแห้ง

นำจากฝรั่งที่ผ่านการเตรียมตาม 3.2.2 มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนกระทั่งได้ค่า  $a_w$  ไม่เกิน 0.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำมาสกัดเพคตินทุกเดือนตามวิธีการข้อ 3.2.1 จนครบ 6 เดือน เปรียบเทียบปริมาณเพคตินที่สกัดได้