บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาผลผลิต และสภาวะในการผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ

3.1 ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาปริมาณผลผลิตกรดซิตริกที่ได้จากกระบวนการหมัก มีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ 1) เชื้อจุลินทรีย์ และ 2) สับสเตรต (เศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเชื้อรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ TISTR 3063 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งมีรายละเอียดของเชื้อ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดของเชื้อ *Aspergillus niger*

TISTR Number	3063
Organism Name	*Aspergillus niger*
Type Strain	-
Original No.	No.Indochina
History	-
Source	Alcohol distillery
Applications	Amylase production
Temperature	30°C
Medium	5

3.1.2 สับสเตรตที่ใช้ในการศึกษา

สับสเตรตที่ใช้ในการหมักเพื่อให้เกิดผลผลิตกรดซิตริก (ภาพที่ 1) ได้แก่

1) ขนุน ใช้ส่วนซังของขนุน

2) สับปะรด ใช้ส่วนแกนของสับปะรด

3) แตงโม ใช้ส่วนเปลือกของแตงโม

ภาพที่ 1 สับเสตรตที่ใช้ในกระบวนการหมักกรดซิตริก

3.1.3 การเตรียมสับสเตรต และเชื้อจุลินทรีย์

1) เตรียมสับสเตรต (เศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซังขนุน แกนสับปะรด และเปลือกแตงโม) เพื่อใช้ในการหมักบนอาหารแข็ง โดยทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นอาหารในครัวเรือนทั่วไป เพื่อให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน สับสเตรตส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบ อีกส่วนหนึ่งนำไปชั่งให้ได้ปริมาณต่าง ๆ ตามที่ได้ออกแบบชุดทดลองไว้ เพื่อใช้ในการจำลองกระบวนการหมัก

2) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ (เชื้อรา) โดยทำการเพาะเชื้อจากหลอดเชื้อแห้งแข็ง (Revival of Freeze-Dried Cultures) ตามวิธีของสถาบันวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ข) โดยเริ่มจากการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง (agar) และทำการถ่ายเชื้อจากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว (PDA) (รายละเอียดส่วนประกอบแสดงดังภาคผนวก ค) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวลงในน้ำยา tween 80 เขย่าให้เข้ากัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ตามลำดับ

3.2 เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูล

3.2.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม และถ่ายเชื้อรา ได้แก่ ห่วงถ่ายเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเพาะเชื้อ ขวดดูแรน และหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเตรียมสับสเตรตเพื่อใช้ในการหมัก ได้แก่ เครื่องปั่น

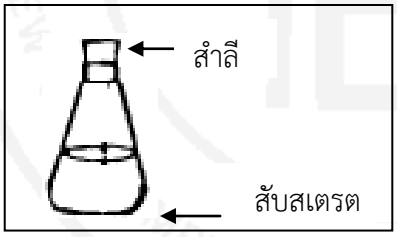
3. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ และสำลีปิดปากขวด

4. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้แก่ กระบอกฉีดยาพร้อมกระดาษกรอง 0.2 μ เครื่องปั่นเหวี่ยง หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ปริมาตร 2.0 mL และขวดซีรั่มขนาดเล็กสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

5. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ เครื่องวัดพีเอช ตู้อบ เตาเผา ชุดย่อย และกลั่นแอมโมเนีย

โดยชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก และชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แสดงดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก (ก) อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง (ข) และอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ค)



(ก)

(ข)

filtrate needle

centrifuge

gc vial

กระดาษกรอง 0.2 μ

micro-centrifuge tube (vol. 2.0 mL)

กระบอกฉีดยา

(ค)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ซีโอดี ได้แก่

- สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไดโครเมต เข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- กรดซัลฟุริก และซิลเวอร์ซัลเฟต
- สารละลายมาตรฐานเฟรัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 นอร์มัล
- สารละลายเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์
- กรดซัลฟามิก (Sulfamic Acid)
- สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (Potassium Hydrogen Phthalate หรือ KHP)
- สารละลายกลูโคส

2) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทีเคเอ็น ได้แก่

- สารละลายปรอทซัลเฟต
- น้ำยาสำหรับย่อยสลาย (Digestion Reagent)
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ – โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium Hydroxide-Sodium Thiosulfate Reagent)
- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์

(รายละเอียดสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ง)

3.2.3 วิธีวิเคราะห์

1) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (HPLC UV/VIS detector)

2) ปริมาณกรดซิตริก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (HPLC UV/VIS detector)

3) ปริมาณกรดไขมันระเหย

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหย วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (HPLC UV/VIS detector)

4) ซีโอดี

การวิเคราะห์ซีโอดี ใช้วิธี Closed reflux method

(รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก จ)

4) ทีเคเอ็น

การวิเคราะห์ทีเคเอ็น ใช้วิธี Kjeldahl method

(รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก จ)

3.2.4 พารามิเตอร์ และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้ (ตารางที่ 3) ประกอบด้วย

1) พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของสับสเตรต มี 9 พารามิเตอร์ ได้แก่ พีเอช ของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยง่าย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น น้ำตาลทั้งหมด และเซลลูโลส* (*ใช้ข้อมูลจากงานวิจัยอื่น)

2) พารามิเตอร์ที่ใช้วัดปริมาณผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ มี 2 พารามิเตอร์ ได้แก่ ปริมาณกรดซิตริก และปริมาณกรดไขมันระเหย

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 เก็บข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

ส่วนที่ 1 การศึกษาส่วนประกอบของเศษของเสียจากผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ ซังขนุน แกนสับปะรด และเปลือกแตงโม โดยส่วนประกอบของผลไม้ทั้ง 3 ชนิดที่ทำการศึกษา ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยง่าย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ส่วนที่ 2 การทดลองเพื่อศึกษาปริมาณผลผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ โดยใช้วิธีการหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation)

ส่วนที่ 3 การทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดทดลอง ดังนี้ 1) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30ºC

2) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 35ºC

3) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40ºC

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์	**ส่วนประกอบของสับสเตรต**	**ผลผลิตจากกระบวนการหมัก**	**วิธีวิเคราะห์/เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์**
ความเป็นกรดด่าง (pH)*	√	√	Electrometric method
ของแข็งทั้งหมด* (Total solids)	√		อบที่ 103-105°C
ของแข็งระเหยง่าย* (Volatile solid)	√		เผาที่ 550 °C
เถ้า (Ash)*	√		เผาที่ 550 °C
ความชื้น (Moisture)*	√		อบที่ 135 °C
ซีโอดี (COD)*	√		Closed reflux method
ทีเคเอ็น (TKN)*	√		Kjeldahl method
น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)	√	√	HPLC (HPLC UV/VIS detector)
เซลลูโลส (Cellulose)**	√		-
กรดซิตริก (Citric acid)		√	HPLC (HPLC UV/VIS detector)
กรดไขมันระเหย (Volatile fatty acid)		√	HPLC (HPLC UV/VIS detector)

* วิธีวิเคราะห์ตาม APHA. (1998)

** ใช้ข้อมูลจากงานวิจัยอื่น (อนันท์ เชาว์เครือ และคณะ (2555) จินตนา บมขุนทด (2555) และ “แตงโม / โภชนาการ” (ม.ป.ป) : ออนไลน์)

โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน (แผนภูมิที่ 5) ดังนี้

1) ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาส่วนประกอบของเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวางแผนออกแบบชุดทดลอง

2) ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาปริมาณผลผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ

3) ส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตกรดซิตริกจากกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ

แผนภูมิที่ 5 ขั้นตอนการศึกษา

3.3.2 รูปแบบชุดทดลอง

ชุดทดลองกระบวนการหมักเศษของเสียจากผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ ซังขนุน แกนสับปะรด และเปลือกแตงโม มี 3 รูปแบบ (ภาพที่ 3) โดยในแต่ละรูปแบบมีปริมาณสับสเตรต และเชื้อจุลินทรีย์เท่ากันทุกรูปแบบ คือ 10 g (w/w) และ 5% (w/w) ตามลำดับ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

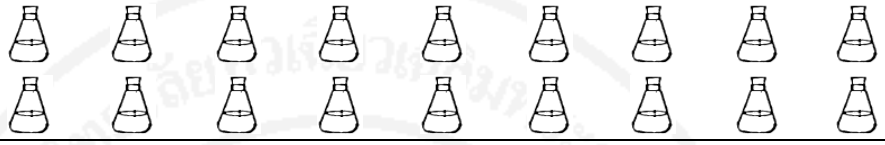
1) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C

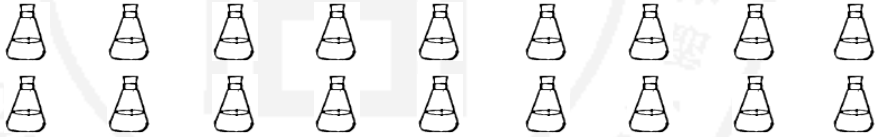
2) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 35°C

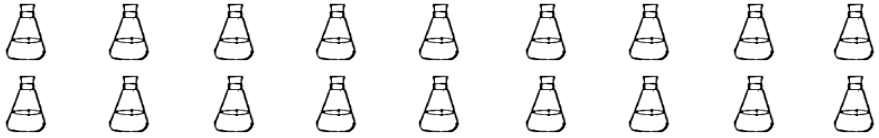
3) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40°C

ภาพที่ 3 รูปแบบชุดทดลอง

รูปแบบที่ 1 ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
ซังขนุน									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
แกนสับปะรด									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

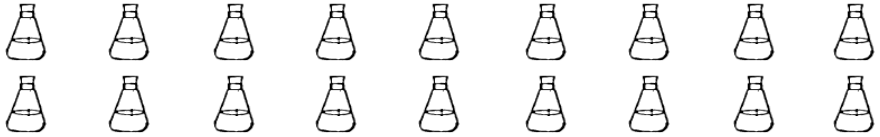
ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
เปลือกแตงโม									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ภาพที่ 3 (ต่อ)

รูปแบบที่ 2 ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 35°C

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
ซังขนุน									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
แกน สับปะรด									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

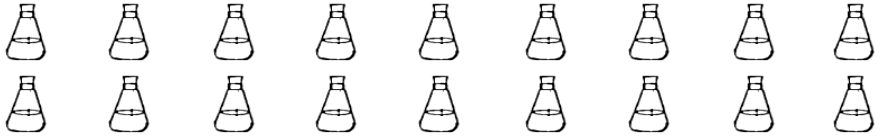
ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
เปลือก แตงโม									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ภาพที่ 3 (ต่อ)

รูปแบบที่ 3 ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40°C

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
ซังขนุน									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
แกน สับปะรด									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

ชุดควบคุม (เซลลูโลส)									
เปลือก แตงโม									
วันที่	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**	**9**	**11**

3.3.3 ขั้นตอนการจำลองกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดซิตริก (แบบ Solid state fermentation)

ขั้นตอนการจำลองกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดซิตริก มีดังต่อไปนี้

1) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

2) เตรียมสับสเตรตแต่ละชนิด โดยการปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3) แบ่งชุดทดลองตามอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก เป็น 3 ชุดทดลอง ได้แก่ ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 35°C และชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40°C

4) ชั่งสับสเตรตแต่ละชนิดใส่ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 mL อย่างละ 10 g (w/w)

5) ทำการวัดค่าพีเอชของสับสเตรตแต่ละชนิด และชั่งสับสเตรตตามที่ได้ออกแบบไว้

6) ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยสำลี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7) ทำการถ่ายเชื้อรา 5% (w/w) ลงบนสับสเตรตดังกล่าว แล้วนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ตามรูปแบบชุดทดลองแต่ละรูปแบบ

8) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดซิตริก และกรดไขมันระเหย

3.3.4 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

1) เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองที่ทำการควบคุมอุณหภูมิในแต่ละวัน โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 2 ชุด ๆ หนึ่งนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างดังกล่าว จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาณ 100 mL เขย่าจนละลาย วัดค่าพีเอช แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 μ

2) นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองจากข้อ 1) ไปสกัด (extract) ด้วยกรดซัลฟุริค 1% (w/w) ปั่นตัวอย่างที่ทำการสกัดแล้วด้วยเครื่องเหวี่ยง โดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นอนุภาคออกจากส่วนของเหลวอย่างแท้จริง แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 μ อีกครั้ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริกด้วยเครื่อง HPLC (HPLC UV/VIS detector)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละ

3.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา

ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับ	กิจกรรม	พ.ศ. 2556							พ.ศ. 2557												พ.ศ. 2558					
		มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.
1	ทบทวนแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยและปริมาณผลผลิตกรดซิตริกที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยใช้ชีวมวล/ของเสียชนิดต่างๆ																									
2	เสนอขออนุมัติหัวข้อวิทยานิพนธ์ และจัดทำเค้าโครงวิทยานิพนธ์																									
3	สอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์																									
4	เตรียมการวางแผนเกี่ยวกับอุปกรณ์ ที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง จัดเตรียมสับสเตรต วิธีวิเคราะห์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์																									
5	ดำเนินการทดลองตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้																									
6	เก็บและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง																									
7	สรุปข้อมูลและจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์																									
8	สอบป้องกันวิทยานิพนธ์																									

3.6 ข้อจำกัดของการศึกษา

ข้อมูลปริมาณผลผลิตกรดซิตริกจากการหมักเศษของเสียจากผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะของการศึกษาครั้งนี้เท่านั้น โดยหากต้องการนำผลผลิตกรดซิตริกที่ได้ไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และสับสเตรตที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ไม่ได้ทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้น และควบคุมปริมาณความชื้น