# บทที่ 3
# ระเบียบวิธีการวิจัย

## 3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักเศษผลไม้ มีส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือ 1) เชื้อจุลินทรีย์ และ 2) สับสเตรต (เศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เชื้อจุลินทรีย์ ชนิดแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ TISTR 926 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งมีรายละเอียดของเชื้อ ดังตารางที่ 7

**ตารางที่ 7** รายละเอียดของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ TISTR 926

| | |
|---|---|
| TISTR Number | 926 |
| Organism Name | *Lactobacillus plantarum* |
| Type Strain | - |
| Original No. | KM1-1 |
| History | NRIC 1838=JCM 8348 |
| Source | Fermented sticky rice (Khao-mak) |
| Applications | Lactic acid production |
| Temperature | 30ºC |
| Medium | - |

3.1.2 สับสเตรตที่ใช้ในการศึกษา

สับสเตรตที่ใช้ในการหมักเพื่อให้เกิดผลผลิตกรดแลคติก (ภาพที่ 2) ได้แก่

1) ขนุน ใช้ส่วนซังของขนุน

2) สับปะรด ใช้ส่วนแกนของสับปะรด

3) แตงโม ใช้ส่วนเปลือกของแตงโม

**ภาพที่ 2** สับสเตรตที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซังขนุน (ก) แกนสับปะรด (ข) เปลือกแตงโม (ค)

ก่อนปั่น

(ก) (ข) (ค)

หลังปั่น

(ก) (ข) (ค)

3.1.3 การเตรียมสับสเตรตและเชื้อจุลินทรีย์

1) เตรียมสับสเตรต (เศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ซังขนุน แกนสับปะรด และเปลือกแตงโม) เพื่อใช้ในกระบวนการหมัก โดยทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นอาหารในครัวเรือนทั่วไป เพื่อให้ มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และชั่งให้ได้ปริมาณต่าง ๆ ตามที่ได้ออกแบบชุดทดลองไว้

2) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการเพาะเชื้อจากหลอดเชื้อแห้งแข็ง (Revival of Freeze-Dried Cultures) ตามวิธีของสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ข)

**3.2 เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูล**

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1) บิวเรต

2) ขวดรูปชมพู่

3) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

4) เครื่องปั่นอาหาร

5) ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก ประกอบด้วย ขวดซีรั่ม (Vial) จุกยาง และฝาอลูมิเนียม

6) แคล้มพ์ล็อค

7) ก๊าซเฉื่อย (Ar)

8) อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ประกอบด้วย เข็ม และกระบอกฉีดยา

9) เครื่องวัดพีเอช

10) เครื่องเหวี่ยงสาร (Centrifuge)

11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

12) สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

13) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

14) หลอดทดสอบ (Test tube)

โดยชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักและอุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 3

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar)

1) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ได้แก่

1.1) สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1.2) สารละลายฟีนอลเข้มข้น ร้อยละ 5

1.3) กรดซัลฟูริกเข้มข้น

(รายละเอียดการเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังภาคผนวก ข)

2) สารเคมีสำหรับเก็บรักษาตัวอย่าง

2.1) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ($H_2SO_4$) 25% v/v

**ภาพที่ 3** ชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก (ก) อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง (ข) และอุปกรณ์สำหรับเตรียมอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ค)

(ก) (ข)

(ค)

3.2.3 พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์

พารามิเตอร์ที่ใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้ (ตารางที่ 8) ประกอบด้วย

1) พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาส่วนประกอบของสับสเตรต มี 11 พารามิเตอร์ ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง ของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยง่าย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น น้ำมันและไขมัน น้ำตาลทั้งหมด เซลลูโลส* และคาร์โบไฮเดรต* (เซลลูโลส และคาร์โบไฮเดรต ใช้ข้อมูลจากงานวิจัยอื่น)

2) พารามิเตอร์ที่ใช้วัดปริมาณผลผลิตและสภาวะที่ใช้สำหรับกระบวนการหมักเศษผลไม้ ได้แก่ปริมาณกรดแลคติก ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

**ตารางที่ 8** พารามิเตอร์และวิธีวิเคราะห์

| พารามิเตอร์ | ส่วนประกอบของสับสเตรต | ผลผลิต/สภาวะในการหมัก | วิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|---|
| 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 |
| น้ำมันและไขมัน* (Oil & Grease) | √ | | Soxhlet Extraction |
| น้ำตาลทั้งหมด** (Total sugar) | √ | | Colorimetric method |
| เซลลูโลส*** (Cellulose) | √ | | เผาที่ 500 °C |
| คาร์โบไฮเดรต*** (Carbohydrate) | √ | | - |
| กรดแลคติก (Lactic acid) | | √ | วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC |

* วิธีวิเคราะห์ตาม APHA. (1998)

** รายละเอียดวิธีการวิเคราะห์แสดงดังภาคผนวก ค

*** ข้อมูลจากงานวิจัยอื่น

**3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล**

3.3.1 เก็บข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

1) ข้อมูลส่วนประกอบของเศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้อมูลค่าความเป็นกรดด่าง ของแข็งทั้งหมด ของแข็งระเหยง่าย เถ้า ความชื้น ซีโอดี ทีเคเอ็น น้ำมันและไขมัน น้ำตาลทั้งหมด เซลลูโลส* และคาร์โบไฮเดรต* (เซลลูโลส และคาร์โบไฮเดรต ใช้ข้อมูลจากงานวิจัยอื่น)

2) ข้อมูลปริมาณผลผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมักเศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ

3) ข้อมูลสภาวะสำหรับกระบวนการหมักเศษผลไม้เพื่อให้เกิดกรดแลคติก ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น (Initial pH) และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (Fermented Temperature)

โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน (แผนภูมิที่ 5) ดังนี้

1) ส่วนที่ 1 เป็นการศึกษาส่วนประกอบของเศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวางแผนออกแบบชุดทดลอง

2) ส่วนที่ 2 เป็นการศึกษาปริมาณผลผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมักเศษผลไม้ชนิดต่างๆ

3) ส่วนที่ 3 เป็นการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมักเศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ

3.3.2 รูปแบบชุดทดลอง

ชุดทดลองกระบวนการหมักเศษผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ ซังของขนุน แกนของสับปะรด และเปลือกของแตงโม มี 3 รูปแบบ (ภาพที่ 4) โดยในแต่ละรูปแบบ มีปริมาณสับสเตรตและเชื้อจุลินทรีย์เท่ากันทุกรูปแบบ คือ 5 gน้ำตาล และ 5% (v/v) ตามลำดับ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C

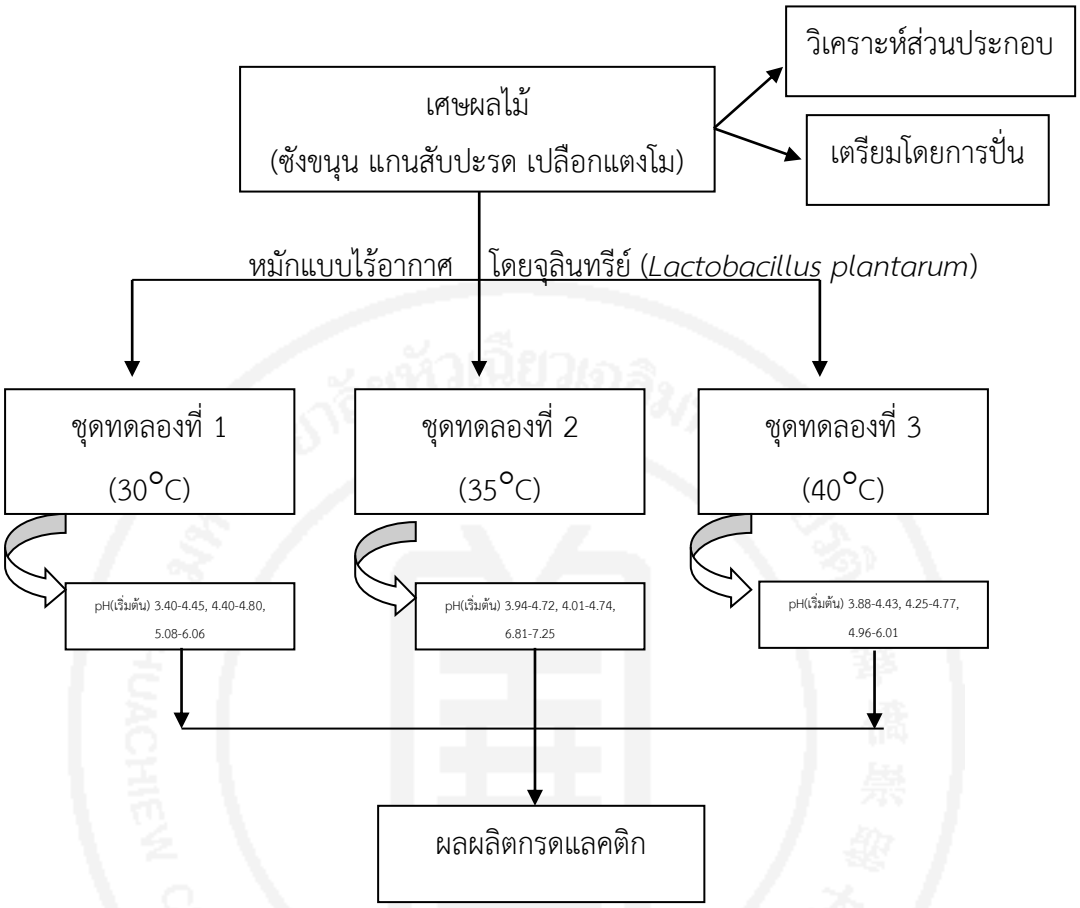
2) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 35°C

3) ชุดทดลองกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40°C

โดยในชุดทดลองแต่ละชุด ประกอบด้วย

| | |
|---|---|
| ชุดควบคุม 1 (กลูโคส-ไม่ปรับ pH) | จำนวน 3 ซ้ำ |
| ชุดควบคุม 2 (สับสเตรต-ไม่ปรับ pH) | จำนวน 3 ซ้ำ |
| ชุดปรับ pH 3.40 – 4.72 | จำนวน 3 ซ้ำ |
| ชุดปรับ pH 4.01 – 4.80 | จำนวน 3 ซ้ำ |
| ชุดปรับ pH 4.96 – 7.25 | จำนวน 3 ซ้ำ |

**แผนภูมิที่ 5** วิธีการศึกษา



**ภาพที่ 4** รูปแบบชุดทดลอง

3.3.3 ขั้นตอนการจำลองกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติก (แบบ Aseptic fermentation)

ขั้นตอนการจำลองกระบวนการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติก มีดังต่อไปนี้

1) เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

2) เตรียมสับสเตรตแต่ละชนิด โดยการปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3) ชั่งสับสเตรตแต่ละชนิดใส่ในขวดซีรั่ม (Vial) อย่างละ 5 gน้ำตาล/L และทำการปรับปริมาตร/ปรับพีเอช ด้วยสารละลายบัพเฟอร์

4) เป่าด้วยก๊าซเฉื่อย (Ar) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เพื่อทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ แล้วปิดด้วยจุกยาง ฝาอลูมิเนียม และใช้แคล้มพ์ล็อคให้ขวดปิดสนิท

5) นำขวดซีรั่มจากขั้นตอนที่ 4 ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6) ใส่เชื้อแบคทีเรีย 5% (v/v) ลงในขวดซีรั่มที่บรรจุสับสเตรตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากขั้นตอนที่ 5

7) นำขวดซีรั่ม (Vial) ที่บรรจุสับสเตรตและเชื้อแบคทีเรียจากขั้นตอนที่ 6 ใส่ในตู้อบอุณหภูมิต่าง ๆ ตามรูปแบบชุดทดลองแต่ละรูปแบบ (30, 35, 40°C)

8) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่เกิดขึ้น

3.3.4 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

1) เก็บตัวอย่างจากชุดทดลองที่ทำการควบคุมอุณหภูมิในแต่ละวัน โดยใช้เข็มสำหรับเก็บตัวอย่างดูดส่วนที่เป็นของเหลวจากในขวดซีรั่ม

2) ปั่นแยกตัวอย่างที่ทำการเก็บตัวอย่างมาจากขั้นตอนที่ 1 เพื่อแยกส่วนที่เป็นอนุภาคออกจากส่วนของเหลวอย่างแท้จริง โดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 $\mu$ อีกครั้ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (refractive index (RI) detector and Aminex HPX-87H column x 7.8 mm)

3) นำไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และผลผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid) ที่ได้จากการหมักสับสเตรตตามช่วงเวลาในการหมัก

**3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละ

### 3.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา

ระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษา แสดงดังตารางที่ 9

**ตารางที่ 9** 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. |
| 1 | ทบทวนแนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยและปริมาณผลผลิตกรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้ชีวมวล/ของเสียชนิดต่างๆ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | เสนอขออนุมัติหัวข้อวิทยานิพนธ์ และจัดทำเค้าโครงวิทยานิพนธ์ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | เตรียมการวางแผนเกี่ยวกับอุปกรณ์ ที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง วิธีเตรียมสับสเตรตและเชื้อจุลินทรีย์ วิธีวิเคราะห์และสารเคมีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | สอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และแก้ไขตามข้อเสนอแนะของคณะกรรมการสอบฯ และเสนอขอจริยธรรมการวิจัย | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | ดำเนินการทดลองตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้ | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | เก็บและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| 7 | สรุปข้อมูลจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| 8 | ส่งบทความวิจัยตีพิมพ์ สอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และแก้ไขรูปเล่มวิทยานิพนธ์ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

**3.6 ข้อจำกัดของการศึกษา**

ข้อมูลปริมาณผลผลิตกรดแลคติกจากการหมักเศษผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะของการศึกษาครั้งนี้เท่านั้น โดยหากต้องการนำผลผลิตกรดแลคติกที่ได้ไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學