บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

น้ำเวย์ที่ใช้ในการทดลองได้จากโรงงานแปรรูปน้ำนมของ หน่วยวิจัยนมและผลิตภัณฑ์นม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

1) เครื่องวัดสี (chromameter, Minolta: Model CR 300 , Japan)
2) เครื่องวัดความหนืด (brookfield-Programmable; DV-II^{+} viscometer, Germany)
3) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 digits electronic analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)
4) ตู้อบลมร้อนไฟฟ้า (hot air oven, Memmert: UM100-UM800, Germany)
5) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath, Memmert, Germany)
6) บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร (beaker, Pyrex, England)
7) โถแก้วดูดความชื้น (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น
8) ถ้วยอลูมีเนียมมีฝาปิดใส่ตัวอย่างเพื่อหาความชื้น (moisture can)
9) กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร (cylinder; Pyrex, USA)
10) หลอดแก้วทดลอง (test tube; Pyrex, USA)
11) ปิเปตขนาด 3 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
12) กระบอกฉีดน้ำกลั่น
13) ตะแกรงลวด
14) ถ้วยพลาสติก

3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและไฟฟ้า

1) เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง และค่าความนำไฟฟ้า (pH-conductometer; Consort, Belgium)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) หัววัดค่า pH
3) หัววัดค่า conductivity
4) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 digits electronic analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)
5) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (3 digits electronic analytical balance, DENSER instrument: Model TB-403, Germany)
6) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer; Spectro 22, USA)
7) ตู้อบลมร้อนไฟฟ้า (hot air oven, Memmert: UM100-UM800, Germany)
8) อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath, Memmert, Germany)
9) ถ้วยอลูมีเนียมมีฝาปิดใส่ตัวอย่างเพื่อหาความชื้น (moisture can)
10) โถแก้วดูดความชื้น (desicator) ที่มีสารดูดความชื้น
11) เครื่องให้ความร้อนแบบเตาไฟฟ้า (hot plate) ยี่ห้อ E.G.O. code 18715
12) เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer, OAKTON, Japan)
13) ไมโครปิเปต ขนาด 20-1000 ไมโครลิตร (Brand, Germany)
14) กรวยแยก ขนาด 250 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
15) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (erlenmeryer flask, Germany)
16) บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร (beaker; pyrex, England)
17) กระบอกตวง ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
18) Cuvette ขนาด 4.5 มิลลิลิตร (Glassbrand®, South Africa)
19) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
20) ช้อนตักสารเคมี
21) Tip (Scientific plastic, USA)
22) หลอดหยด
23) แท่งแก้วคน
24) บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร (burette; HEG, Germany)
25) กรวยกรอง
26) ตู้ดูดควัน (Hood; Bosstech fume hood, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในแยกโปรตีนในน้ำเวย์ด้วยวิธี foam fractionation

1) ชุดควบคุมอัตราการไหลของอากาศ (NT-flowmeter; LZB06WB (0.06-0.6 LPM, Japan)
2) ปั๊มอัดอากาศ (air compresser, China)
3) ปั๊มน้ำ (water pump, China)
4) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร (erlenmeryer flask, Germany)
5) วาล์วเปิดปิดแบบ ball valve
6) Glass porous filter porosity No.1, 2 และ 3 (160-100, 100-40 และ 40-16 ไมโครเมตร)
7) แก้วกลวงทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.1, 3.6 และ 5.6 เซนติเมตร ความยาวโดยประมาณ 60 เซนติเมตร
8) กระบอกฉีดยาพลาสติก (Syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร (NISSHO, Japan)
9) บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (beaker; pyrex, England)
10) ขาตั้งเหล็กพร้อมที่จับ
11) หลอดแก้วรูปตัวยู (U) และรูปตัวแอล (L)
12) ตู้เย็น (ยี่ห้อ Whirlpool: Model WCF-95L, Japan)
13) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส (ยี่ห้อ SANYO: Model SF-C997, Japan)
14) สายยางพลาสติก
15) จุกยาง
16) ขวดพลาสติกแบบมีฝาเกลียวสำหรับเก็บตัวอย่าง

3.2.4 เครื่องประมวลผลข้อมูล

1) เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (notebook; BenQ joybook S41, China)

3.2.5 โปรแกรมประยุกต์

1) โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)
2) โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel 2003 (Microsoft corp., USA)

3.3 สารเคมี

1) น้ำกลั่น ตรา โพลสตาร์ (Distillation water, บริษัท เชียงใหม่โพลสตาร์ (1992) จำกัด, ประเทศไทย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper Sulfate, AR Grade, Ajax, Australia)
3) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR Grade, Merck , Germany)
4) โซเดียมโปรแตสเซียมตาร์เตรต (Sodium potassium tartrate, AR Grade, Ajax, Australia)
5) ซิงค์แอซิเทต (Zinc acetate dehydrate, AR Grade, Merck, Germany)
6) กรดอะซิติก (Acetic acid, AR Grade, Merck, Germany)
7) โปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ (Potasium ferocyanide, AR Grade, Merck, Germany)
8) เมทิลีนบลู (Methylene blue indicator, AR Grade, BHD, England)
9) สารละลายแอมโมเนีย (Ammonia solution, AR Grade, Merck, Germany)
10) เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol, AR Grade, Merck, Germany)
11) เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 (Ethyl alcohol, AR Grade, O.V. Chemical & supply, Thailand)
12) ไดเอทิล อีเทอร์ (Diethyl ether, AR Grade, BHD, England)
13) ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether, AR Grade, BHD, England)
14) กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid, AR Grade, Merck, Germany)
15) โบวายซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, Fluka, Switzerland)
16) โคแมสซีบริลเลียนบูล จี250 (Coomassie brilliant blue G250, Fluka, Switzerland)

3.4 วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำเวย์ตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำเวย์ มาทำการวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ดังนี้

สมบัติทางกายภาพ ได้แก่

- วัดค่าสี L*a*b* ด้วยเครื่องวัดค่าสี (Minolta, CR300)
- ค่าความหนืด โดยใช้เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer)
- ค่าความถ่วงจำเพาะ (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด (AOAC, 2000)

สมบัติทางเคมี ได้แก่

- ค่าความเป็นกรด- ด่าง ด้วย pH meter

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ปริมาณน้ำตาลแลคโตส (AOAC, 2000)
- ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์โดย Bradford method (Bradford, 1976)
- ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการสุ่มแบบง่าย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของการเตรียมน้ำเวย์ที่มีต่อสมบัติเกี่ยวกับฟองของน้ำเวย์ตัวอย่าง

การทดลองในขั้นตอนนี้ จะทำการศึกษาการสร้างฟองในระบบปฏิบัติการแบบกะ (batch system) เพื่อพิจารณาสมบัติเกี่ยวกับฟอง (foaming properties) ของน้ำเวย์ โดยใช้อุปกรณ์ที่ประกอบด้วยท่อแก้วทรงกระบอกกลวงยาวประมาณ 60 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.1 เซนติเมตร วางในแนวตั้ง ด้านล่างจะเป็น glass filter ที่มีขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วง 40-100 ไมโครเมตร เพื่อใช้ในการทำให้เกิดฟอง ส่วนด้านบนจะเป็นปลายเปิด และใช้อากาศจากปั๊มลมในการทำให้เกิดฟองก๊าซในน้ำเวย์ พร้อมทั้งมีการติดตั้งเครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้าโดยใช้โลหะแท่งลวดทองแดงเป็นขั้วอิเล็กโทรดในการวัด ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยมีปัจจัยหลักที่ทำการศึกษาคือ 3 ปัจจัย คือ (1) อุณหภูมิในการให้ความร้อนแก่น้ำเวย์ ได้แก่ที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส (2) ระยะเวลาในการคงอุณหภูมิไว้ ได้แก่ ที่ 300, 750 และ 1200 วินาที และ (3) ค่า pH ของน้ำเวย์ ได้แก่ ที่ 4, 6 และ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มอล (N) ในการปรับค่า pH แล้วทำการวัดผลตอบสนองของฟองที่เกิดขึ้นโดยพิจารณาจาก ความสามารถในการเกิดฟอง (foamability) และความสามารถในการคงตัวของฟอง (foam stability) โดยเมื่อสิ้นสุดการให้อากาศเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว วัดระดับความสูงของฟองเทียบกับระดับที่ผิวของของเหลวตัวอย่าง และจับเวลาภายใน 1 นาทีหลังจากปิดระบบของเครื่องแล้ว สังเกตลักษณะการยุบตัวของฟองและวัดความสูงในช่วงเวลานั้น นำผลมาวิเคราะห์หาค่า foaming properties ของฟองที่เก็บได้และสารละลายที่เหลืออยู่ในคอลัมน์ โดยวิธีการวัดความนำไฟฟ้า (conductometric method) และวิธีการวัดปริมาตร (volumetric method) ดังนี้

ก) วิธีการวัดความนำไฟฟ้า (Conductometric method) ดัดแปลงจาก (Glaser *et al.*, 2007)

ค่า foamability และ foam stability สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ ดังสมการ (1)

$$\text{Foamability (\%)} = (C_{t30}/C_i) \times 100 \quad (1)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

C_{t30} คือ ค่า conductivity ของฟองนาทีที่ 30

C_i คือ ค่า initial conductivity ของสารละลายโปรตีน

foam stability สามารถแสดงได้ในเทอมของ foam density stability (FDS) โดยวัดค่า conductivity ของฟองตรงเวลานาที ณ ที่ 31 (C_{t31}) และคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของเวลานาที ณ ที่ 30 (C_{t30}) ดังสมการ (2)

$$FDS\% = (Ct_{31}/Ct_{30}) \times 100 \quad (2)$$

ข) วิธีการวัดปริมาตร (Volumetric method) ดัดแปลงจาก (Mohan *et al*., 2006)

foamability แสดงในเทอม foam expansion (% FE) โดยค่าแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรที่เพิ่มขึ้นหลังจากให้อากาศแก่สารละลายโปรตีนนาน 30 นาที เทียบกับปริมาตร ดังสมการ (3)

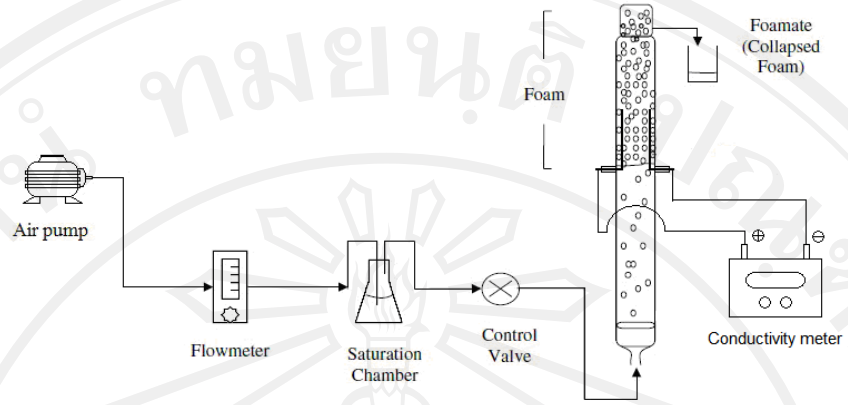
$$\% \text{ Foam expansion (FE)} = \frac{\text{foam volume (ml) at 30 min}}{\text{initial liquid volume}} \times 100 \quad (3)$$

foam stability แสดงในเทอม foam volume stability (FVS) โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรฟองที่เหลืออยู่ หลังเวลาผ่านไป 1 นาที ที่อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ดังสมการ (4)

$$\text{Foam volume stability (\%)} = \frac{\text{Volume of foam (ml) at 31 min}}{\text{Volume of foam (ml) at 30 min}} \times 100 \quad (4)$$

ทำการวางแผนการทดลองแบบ 3^3 factorial in CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (จรัญ, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

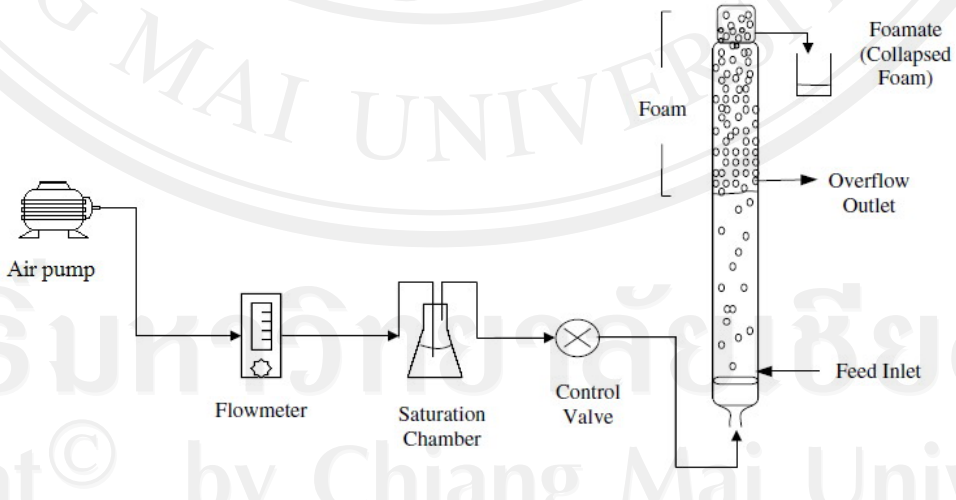


รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการจัดอุปกรณ์การทดลองระบบปฏิบัติการแบบกะ โดยวัดค่าความนำไฟฟ้าและวัดปริมาตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก Shea *et al*. (2009)

ตอนที่ 3 การศึกษาผลของตัวแปร ด้านการปฏิบัติการที่มีต่อประสิทธิภาพของกระบวนการแยกเวย์โปรตีนจากน้ำเวย์ โดยเทคนิคการสร้างฟองแบบต่อเนื่อง

การทดลองในตอนนี้เป็นการศึกษาการแยกเวย์โปรตีนจากน้ำเวย์โดยเทคนิคการสร้างฟองแบบต่อเนื่องแสดง โดยทำการจัดอุปกรณ์การทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3.2 ซึ่งมีลักษณะการจัดวางเช่นเดียวกันกับในรูปที่ 3.1 แต่นำเครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้าออกไปแล้วเพิ่มปั๊มน้ำที่เป็นตัวช่วยในการปั๊มน้ำเวย์ให้มีการไหลวนแบบต่อเนื่องในระบบ



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการจัดอุปกรณ์การทดลองแยกเวย์โปรตีนจากน้ำเวย์ โดยเทคนิคการสร้างฟองแบบต่อเนื่อง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Shea *et al*. (2009)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยนำผลการทดลองที่ได้จากการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำเวย์ของตอนที่ 2 มาใช้ในขั้นตอนนี้ ซึ่งปัจจัยที่ใช้ในการศึกษามีด้วยกันอยู่ 3 ปัจจัยหลักคือ (1) ความเร็วการไหลของอากาศ (superficial air velocity) 3 ระดับ คือ 0.25, 0.33 และ 0.42 เซนติเมตรต่อวินาที (2) ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ที่ขนาดแตกต่างกัน ได้แก่ 2.1, 3.6 และ 5.6 เซนติเมตร และ (3) ขนาดของรูพรุนของ glass filter ได้แก่ ช่วง 160-100 ไมโครเมตร ช่วง 100-40 ไมโครเมตร และช่วง 40-16 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บน้ำตัวอย่างทั้งในส่วนของฟองกับสารละลายที่เหลือในคอลัมน์หลังจากการทดลองนาน 60 นาที ไปทำการวิเคราะห์สมบัติทางภาพและเคมีเช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 ทำการวางแผนการทดลองแบบ 3^3 factorial in CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองมาหาค่าเฉลี่ย และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) เมื่อพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (จรัญ, 2549) ทำการประเมินประสิทธิภาพการแยก โดยการคำนวณหาค่า Enrichment และ Recovery ของโปรตีน น้ำตาลแลคโตส และไขมัน ดังนี้ ดัดแปลงจาก (Shea *et al*., 2009)

$$\text{Enrichment} = \frac{[\text{Protein or Lactose or Fat}]_{\text{Foamate}}}{[\text{Protein or Lactose or Fat}]_{\text{Initial}}} \quad (5)$$

$$\text{Recovery} = \frac{[\text{Protein or Lactose or Fat}]_{\text{Foamate}} \times \text{Volume Foamate}}{[\text{Protein or Lactose or Fat}]_{\text{Initial}} \times (\text{Volume Column} + \text{Volume Foamate})} \quad (6)$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved