

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย



วัตถุดิบ

- 1) มะพร้าวพันธุ์ต้นสูง (*Cocos nucifera* Linn.) จากสวนในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เนื่องจากคุณภาพของวัตถุดิบเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ จึงกำหนดคุณภาพของมะพร้าวที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้ ใช้มะพร้าวอายุประมาณ 10 เดือน โดยสังเกตได้จากเปลือกค้ำนอกสีเขียวเข้มถึงสีน้ำตาลแดง กาบมะพร้าวสีน้ำตาล มีน้ำเกือบเต็มผล เนื้อสีขาว มีความหนาประมาณ 1.0 เซนติเมตร
- 2) เชื้อ *Lactobacillus plantarum* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 3) เอนไซม์ Viscozyme L (100 FBG/g) เป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วย cellulose, hemicellulase, arabanase, xylase และ beta-glucanase จากบริษัท ยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด ประเทศไทย

สารเคมี

- 1) กรดอะซิติก (Acetic acid) บริษัท Anala ประเทศอังกฤษ
- 2) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท บริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี
- 3) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide หรือ KI) บริษัท Labscan Asia ประเทศไทย
- 4) โซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium Thiosulfate) บริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี
- 5) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide) บริษัท Labscan Asia ประเทศไทย
- 6) ไดเอทิลอีเทอร์ (Dithyl ether) บริษัท Labscan Asia ประเทศไทย
- 7) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbon Tetrachloride) บริษัท Labscan Asia ประเทศไทย
- 8) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) บริษัท Labscan Asia ประเทศไทย
- 9) ฟีนอล์ฟทาเลิน (Phenolphthalein) บริษัท M&B ประเทศอังกฤษ

เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Checkweigher) Satorius รุ่น AC 2115-00 ประเทศเยอรมันนี
- 2) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Checkweigher) Satorius รุ่น BA 610 ประเทศเยอรมันนี
- 3) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) Heto รุ่น CB60BX ประเทศเดนมาร์ก
- 4) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Centrifuge) (Hermles, Z223K, Germany)
- 5) ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer) ประเทศไทย

- 6) เครื่องสกัดน้ำผลไม้ (Moulinex) รุ่น 753 ประเทศสเปน
- 7) เครื่องทำสุญญากาศแบบไดอะเฟรม รุ่น V-502 ประเทศสวีเดน
- 8) ตู้บ่ม (Incubator) Memert รุ่น ULE500 ประเทศเยอรมนี
- 9) เครื่องบีบอัดแบบสกรู
- 10) กระจาขกรอง membrane filter
- 11) เทอร์โมมิเตอร์
- 12) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัส
- 13) อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์
- 14) อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- 15) อุปกรณ์งานครัว

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การศึกษาผลของวิธีการและสภาวะในการสกัดที่มีต่อปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าว

3.1.1 การสกัดน้ำมันมะพร้าวจากน้ำกะทิ

3.1.1.1 การเตรียมน้ำกะทิ

เตรียมน้ำกะทิโดยนำมะพร้าวแก่มาปอกเปลือกเอากะลาออก หั่นเป็นชิ้นป่นแยกกากโดยใช้เครื่องปั่นน้ำผลไม้แบบแยกกากได้เพื่อแยกส่วนของน้ำกะทิ หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาคั้นน้ำกะทิจากด้วยน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนของเนื้อมะพร้าวต่อน้ำ 1:1 (ดัดแปลงจาก Che Man, Abdul Karim, and Teng, 1997) นำน้ำกะทิทั้ง 2 ส่วน มาผสมกันสำหรับใช้ในการสกัดน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีทางธรรมชาติ วิธีหมุนเหวี่ยงและวิธีทางชีวภาพต่อไป

3.1.1.2 การหาปริมาณเชื้อ *L.plantarum* ที่เหมาะสมต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าว

การหาปริมาณของเชื้อ *L.plantarum* ทำได้โดยนำเชื้อ *L.plantarum* ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเมื่อเทียบกับ McFarland Nephelometer Standards เท่ากับ 1.5×10^8 CFU/mL มาทำการเจือจางจนกระทั่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.5×10^6 , 1.5×10^5 และ 1.5×10^4 CFU/ml เติมน้ำปริมาณร้อยละ 1 (โดยปริมาตร) ในน้ำกะทิตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Che Man, Abdul Karim, and Teng, 1997) และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (ดัดแปลงจาก Amarasinghe, Kumarasiri, and Gangodavilage, 2008; ธนานันท์ ตันตกุล, 2549) จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกรองด้วยเครื่อง Vacuum pump ที่ใช้กระจาขกรอง membrane filter ขนาด 2.5 ไมครอน จะได้น้ำมันมะพร้าว นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบ

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวที่สกัดโดยใช้เชื้อปริมาณต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเปรียบเทียบค่าที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple test คัดเลือกปริมาณเชื้อที่ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดไปทำในขั้นตอนต่อไป

3.1.3 การหาปริมาณร้อยละของเชื้อ *L.plantarum* ที่เหมาะสมต่อการสกัดน้ำมันมะพร้าว

นำเชื้อ *L.plantarum* ปริมาณที่คัดเลือกได้ใส่ในน้ำกะทิเป็นปริมาณร้อยละ 1 3 และ 5 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Che Man, Abdul Karim, and Teng, 1997) และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (ดัดแปลงจาก Amarasinghe, Kumarasiri, and Gangodavilage, 2008; ธนานันท์ ตัณฑกุล, 2549) จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกรองด้วยเครื่อง Vacuum pump ที่ใช้กระดาษกรอง membrane filter ขนาด 2.5 ไมครอน จะได้น้ำมันมะพร้าว นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบ

3.1.4 การสกัดน้ำมันมะพร้าวจากกะทิด้วยวิธีทางธรรมชาติ

นำน้ำกะทิมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกรองด้วยเครื่อง Vacuum pump ที่ใช้กระดาษกรอง membrane filter ขนาด 2.5 ไมครอน จะได้น้ำมันมะพร้าว นำไปชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบ

3.1.5 การสกัดน้ำมันมะพร้าวจากกะทิด้วยวิธีหมุนเหวี่ยง

นำน้ำกะทิที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Gunetileke and Laurentius, 1974) ตักส่วนที่เป็นชั้นครีมออก ทิ้งให้ส่วนที่เป็นครีมละลาย และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (ดัดแปลงจาก Amarasinghe, Kumarasiri, and Gangodavilage, 2008 และ ธนานันท์ ตัณฑกุล, 2549) จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกรองด้วยเครื่อง Vacuum pump ที่ใช้กระดาษกรอง membrane filter ขนาด 2.5 ไมครอน จะได้น้ำมันมะพร้าว นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบ

3.1.6 การสกัดน้ำมันมะพร้าวจากกะทิด้วยวิธีทางชีวภาพ

นำน้ำกะทิมาเติมเชื้อ *L.plantarum* ในปริมาณที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนแรก หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Che Man, Abdul Karim, and Teng, 1997) และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 10 นาที ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (ดัดแปลงจาก Amarasinghe, Kumarasiri, and Gangodavilage, 2008 และ ธนานันท์ ตัณฑกุล, 2549) จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ไปกรองด้วยเครื่อง Vacuum pump ที่ใช้กระดาษกรอง membrane filter ขนาด 2.5 ไมครอน จะได้น้ำมันมะพร้าว นำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบหยาบ



การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple test

3.2 การสกัดน้ำมันมะพร้าวจากเนื้อมะพร้าวหูด

3.2.1 การศึกษาผลของปริมาณความชื้นของเนื้อมะพร้าวหูดที่มีต่อการสกัดน้ำมันด้วยเครื่องบีบอัดแบบสกรู

นำเนื้อมะพร้าวหูด 500 กรัม มาอบด้วยเครื่องอบแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ปริมาณความชื้นร้อยละ 15 20 และ 25 (ดัดแปลงมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ม.ป.ป.) จากนั้นนำไปสกัดน้ำมันด้วยเครื่องบีบอัดแบบสกรู ซึ่งน้ำหนักของปริมาณน้ำมันมะพร้าวที่สกัดได้และวัดค่าความชื้น เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณผลผลิตต่อไป

3.2.2 การศึกษาปริมาณของเอนไซม์ Viscozyme L ที่มีผลต่อร้อยละของปริมาณผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวที่สกัดด้วยเครื่องบีบอัดแบบสกรู

นำเนื้อมะพร้าวหูดที่มีความชื้นร้อยละ 50 ± 2 มาเติมเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ Viscozyme L ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 0.6 และ 0.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Sant'Anna et al., 2003) เมื่อครบเวลาการบ่มนำไปอบในเครื่องอบแห้งแบบถาดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ได้ความชื้น ตามที่คัดเลือกได้ จากนั้นนำไปบีบอัดด้วยเครื่องบีบอัดแบบสกรู ซึ่งน้ำหนักของน้ำมันมะพร้าวที่สกัดได้เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณผลผลิตต่อไป

3.3 การศึกษาคุณภาพของน้ำมันมะพร้าวและองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระ

3.3.1 การศึกษาคุณภาพของน้ำมันมะพร้าว

นำน้ำมันมะพร้าวหีบเย็นที่เลือกได้จากข้อ 3.1 และ 3.2 มาวิเคราะห์คุณภาพเปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวหีบเย็นที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม และวิธีที่ไม่ใช้เอนไซม์ ดังนี้

- ความหนืด ด้วยเครื่อง (Brookfield, DV-3, USA)
- ความถ่วงจำเพาะ (AOAC, 1990)
- ค่าสี L* a* และ b* ด้วยเครื่อง Hunterlab (BYK Gardner, 45/0, German)
- Refractive index ด้วยเครื่อง Refractometer (30P, USA)
- ปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)
- ค่า Peroxide value (AOAC, 1990)

- Acid value (AOAC, 1990)
- Iodine value (AOAC, 1990)
- Saponification number (AOAC, 1990)

เปรียบเทียบคุณภาพของน้ำมันมะพร้าว ปริมาณผลผลิต และราคาต้นทุนของการผลิต เพื่อพิจารณาคัดเลือกวิธีการที่มีความเป็นไปได้ต่อการผลิต คือ คุณภาพเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ให้ปริมาณผลผลิตสูงและต้นทุนในการผลิตต่ำ เพื่อใช้ในการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันต่อไป

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน

โดยวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่มีในน้ำมันมะพร้าวเปรียบเทียบกับน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม และน้ำมันมะพร้าวทั่วไป (สกัดด้วยวิธีการเคี้ยวด้วยความร้อน) เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน Philippine National Standard

3.2.3 การวิเคราะห์ความหืนของน้ำมันมะพร้าวที่สกัดได้ น้ำมันทางการค้า และน้ำมันหมู

วิเคราะห์ค่า Thiobarbituric Acid Test (TBA Test) ตามวิธีมาตรฐานของ AOCS (1990) สำหรับน้ำมันมะพร้าวแบบบีบเย็นที่สกัดตามวิธีที่คัดเลือกได้ เพื่อเปรียบเทียบผลกับค่า TBA ของน้ำมันปาล์มทางการค้า และน้ำมันหมู