

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการย่อยที่ 1: การผลิต FOS จากน้ำเชื่อมลำไย

3.1 การผลิต FOS จากน้ำเชื่อมลำไย

3.1.1 การผลิตน้ำเชื่อมลำไยจากลำไยเกรดต่ำแบบคละเกรด

นำลำไยคละเกรด (เกรด B และ C พันธุ์อีดอ) มาคัดแยกเศษและของเสีย จากนั้นล้างทั้งเปลือกให้สะอาดด้วยน้ำประปาแล้วนำมาปั่น/บดให้ละเอียดด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบบีบอัด (screw fruit juice extractor) ซึ่งจะได้ลำไย และกากแยกออกจากกัน นำลำไยที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบาง จะได้เป็นน้ำลำไยความเข้มข้นเริ่มต้น 15-20 องศาบริกซ์ ที่น้ำลำไยให้เกิดการตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คืน จากนั้นดูดเอาส่วนใสด้วยวิธีกลักน้ำ แล้วนำมาระเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 0.1-0.2 บาร์ จะได้น้ำเชื่อมลำไยที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 60-70 องศาบริกซ์

3.1.2 การผลิต FOS จากน้ำเชื่อมลำไยเกรดต่ำแบบคละเกรด

นำน้ำเชื่อมลำไยที่ผลิตได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในช่วง 60-70 องศาบริกซ์ เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นของการผลิต FOS จากนั้นนำน้ำเชื่อมลำไยที่ได้มาสังเคราะห์ให้เป็น FOS ด้วยเอนไซม์ที่มีชื่อทางการค้าว่า Pecnitex Ultra SPL ในถังปฏิกรณ์ (desktop fermenter) ขนาด 10 ลิตร (MDFT-N-10L, B.E. Marubishi Co., Ltd, Thailand) โดยจัดการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง (center point) 3 ซ้ำ โดยแต่ละสิ่งทดลองทำการทดลอง 2 ซ้ำ ผันแปรปริมาตรของเอนไซม์ Pecnitex Ultra SPL ในระดับ 10-60 มิลลิลิตร/น้ำเชื่อมลำไย 1 ลิตร และระยะเวลาทำปฏิกิริยา 3-24 ชั่วโมง จะได้สิ่งทดลองทั้งหมด 11 สิ่งทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.1.1 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื่อมลำไยเริ่มต้นให้เท่ากับ 5.6 ด้วยโซเดียมซิเตรต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ประกอบด้วยกรดซิตริก และโซเดียมซิเตรต) ควบคุมอุณหภูมิถังปฏิกรณ์ที่ 55 องศาเซลเซียส และ

อัตราเร็วในการกวนด้วยใบพัด 150 รอบต่อนาที หยุดปฏิบัติการทำงานของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำน้ำเชื่อมลำไยและ FOS มาวิเคราะห์สมบัติด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส 1^F-ฟรุคโตฟิวราโนซิลนิสโทส นิสโทส และ 1-คีสโทส (Surin *et al.*, 2012) ด้วยเครื่อง HPLC (1260 infinity, Agilent Technologies, USA)

2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ กรดแกลลิก คอริลาจिन และกรดเอลลาจิก (Rangkadilok *et al.*, 2005) ด้วยเครื่อง HPLC (1260 infinity, Agilent Technologies, USA)

3. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Enujiugha *et al.*, 2007), FRAP (Thaipong *et al.*, 2006) และ ABTS (Rabeta and Faraniza, 2013) ด้วย spectrophotometer (Cary60, Agilent Technologies, USA)

3.1.3 การทำแห้ง FOS ผง

นำ FOS ที่ผลิตได้มาผสมมอลโตเดกซ์ตริน ร้อยละ 35.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิต FOS ผงที่ให้ผลได้ดีที่สุดจากการศึกษาของ ศิริลักษณ์ (2550) จากนั้นทำให้เป็นผงด้วยการอบแห้งในตู้อบสุญญากาศ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำ FOS ผงที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเครื่อง HPLC และวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP และ ABTS

ตารางที่ 3.1.1: สิ่งทดลองที่ได้ใช้ในการศึกษาสภาวะการผลิต FOS จากน้ำเชื่อมลำไย

สิ่งทดลอง	Pecnitex Ultra SPL (มิลลิลิตร/น้ำเชื่อมลำไย 1 ลิตร)	เวลาทำปฏิกิริยา (ชั่วโมง)
1	35	1.5
2	10	3
3	60	3
4	9.64	13.5
5	70.36	13.5
6	35	13.5
7	35	13.5
8	35	13.5
9	10	24
10	60	24
11	35	28.5

3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์จากเมล็ดลำไย เปลือกลำไยและกากที่เหลือจากการคั้นน้ำลำไยสด

นำผงจากเมล็ดลำไยสดและเปลือกลำไย รวมทั้งกากที่เหลือจากการคั้นน้ำลำไยสดบดมาอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้น นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแบบค้อน (hammer mill) เพื่อศึกษาสภาวะในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ดังต่อไปนี้

3.2.1 อัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม

นำตัวอย่าง (เมล็ดลำไย เปลือกลำไย และกากจากการคั้นน้ำลำไย) ที่ผ่านการบดให้เป็นผงมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 เกรดอุตสาหกรรม ซึ่งจัดว่าเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อการนำสารสกัดไปทำปฏิกิริยา (Prasad *et al.*, 2009) โดยแปรระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายได้แก่ อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำ เท่ากับ 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 และ 0:100 (คือ น้ำเปล่า ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมชนิดไม่มีขี้) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายควบคุมชนิดไม่มีขี้ โดยทำการสกัดในตู้บ่มชนิดเขย่าได้ (LabTech, Daihan Labtech Co., LTD., Korea) ซึ่งผงตัวอย่าง 5 กรัมละลายในตัวทำละลาย 25 มิลลิลิตร สภาวะที่ใช้ในการสกัด คือ สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วย HPLC เลือกอัตราส่วนตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์เมล็ดลำไย เปลือกลำไย และกากที่เหลือจากการคั้นน้ำลำไยสด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2.2 เวลาการสกัดที่เหมาะสม

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1 มาศึกษาระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสม ด้วยการแปรระยะเวลาสกัดทั้งสิ้น 8 ช่วงเวลา คือ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง โดยสกัดที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วย HPLC เลือกระยะเวลาการสกัดที่ดีที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์เมล็ดลำไย เปลือกลำไย และกากที่เหลือจากการคั้นน้ำลำไยสด เพื่อใช้ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 อุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสม

นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยอัตราส่วนตัวทำละลายและเวลาการสกัดที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาศึกษาอุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสม ด้วยการแปรอุณหภูมิการสกัดตั้งแต่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยสกัดที่สภาวะเขย่า 200 รอบต่อนาที นำสารสกัด

ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วย HPLC ซึ่งจะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดลำไย เปลือกลำไย และกากที่เหลือจากการคั้นน้ำลำไยสด

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดแล้ว นำสารสกัดมาทำให้เข้มข้นและกำจัดตัวทำละลายเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนได้ (Rotavapor, Buchi, Germany) จากนั้นนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาอบแห้งสุญญากาศด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดในรูปผง และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

โครงการย่อยที่ 2: การศึกษาความเป็นพิษของโพลิโกแซคาไรด์จากลำไยในสัตว์ทดลอง

3.3 การศึกษาความเป็นพิษของโพลิโกแซคาไรด์จากลำไยในสัตว์ทดลอง

3.3.1 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาว (OECD 420, 2001)

ใช้หนูขาวเพศเมีย น้ำหนัก 180 - 220 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม (5 ตัว/กลุ่ม)

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม): ได้รับน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 (กลุ่มทดสอบ): ได้รับ FOS ในขนาด 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

จากนั้นเฝ้าดูอาการวันละครั้ง จนครบ 14 วัน หนูที่ตายในระหว่างการทดลองจะได้รับการผ่าตัดตรวจพิสูจน์ซาก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูที่รอดชีวิตทุกตัวต้องได้รับการผ่าตัดเพื่อตรวจดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน

หมายเหตุ: ตามปกติ ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน ถ้าหากสารทดสอบคือ FOS ในขนาด 5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ก่อให้เกิดการตายในสัตว์ทดลอง จะต้องทำการศึกษาโดยลดขนาดของ FOS ลงและหาค่า LD50 ด้วย

3.3.2 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาว (OECD 408, 1998)

ทำการทดลองโดยใช้หนูเพศผู้และเพศเมีย แบ่งหนูเป็น 6 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1-4 ใช้หนูขาว 10 ตัว/เพศ/กลุ่ม ส่วนกลุ่มที่ 5-6 ใช้หนูขาว 5 ตัว/เพศ/กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม): ได้รับน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2-4 (กลุ่มทดสอบ): ได้รับ FOS ในขนาด 500, 1500 และ 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

กลุ่มที่ 5 (กลุ่มควบคุมติดตาม): ได้รับน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 6 (กลุ่มทดสอบติดตาม): ได้รับ FOS ในขนาด 3000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับน้ำกลั่นหรือสารทดสอบอย่างใดอย่างหนึ่ง ทางปากทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน ทั้งนี้ สำหรับกลุ่มที่ 5 จะเป็นกลุ่มควบคุมติดตาม ส่วนกลุ่มที่ 6 จะเป็นกลุ่มทดสอบติดตาม ซึ่งกลุ่มที่ 5-6 จะถูกเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันหลังจากได้น้ำหรือสารทดสอบมาแล้ว 90 วัน ในระหว่างการศึกษา หนูทุกกลุ่มจะได้รับการติดตามดูพฤติกรรม การกินอาหารและการเพิ่มขึ้น

ของน้ำหนักตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทุกกลุ่มจะถูกนำมาทำสลับและเก็บเลือดจาก carotid artery เพื่อส่งเลือดไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

- Hematology ได้แก่ Red blood cell, Hemoglobin, Hematocrit, Mean corpuscular volume, Mean corpuscular hemoglobin, Mean corpuscular hemoglobin concentration, Platelet
- White blood counts
- Biochemistry: Glucose, BUN, Creatinine, Total protein, Albumin, Total bilirubin, Direct bilirubin, Serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT), Serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), Alkaline phosphatase

หลังจากนั้นจะทำการผ่าตัด autopsy และตัดแยกอวัยวะภายในต่าง ๆ ออกมา (ได้แก่ สมอง ตา ปอด หัวใจ ต่อมไทมัส กล้ามเนื้อ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ ตับอ่อน ม้าม ต่อมหมวกไต ไต รังไข่ มดลูก อัณฑะ เอพิดิไดมิส) เพื่อชั่งน้ำหนักและตรวจดูสี ลักษณะหรือความผิดปกติที่อาจจะเกิดขึ้น นำเนื้อเยื่อบรรจุในกล่องที่มี formalin ร้อยละ 10 จากนั้นจึงนำอวัยวะเหล่านี้ส่งตรวจวิเคราะห์ทาง histopathology ต่อไป

3.3.3 การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยมาตรฐาน (mean±S.E.M.) การเปรียบเทียบทางสถิติเพื่อบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้ One-way ANOVA โดยที่ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โครงการย่อยที่ 3: การวิเคราะห์ผลตอบแทนจากการลงทุนและศึกษาศักยภาพเชิงพาณิชย์ของ FOS จากน้ำเชื่อมลำไย

3.4 การวิเคราะห์ผลตอบแทนจากการลงทุนและศึกษาศักยภาพเชิงพาณิชย์ของ FOS จากน้ำเชื่อมลำไย

3.4.1 การศึกษาลักษณะทั่วไปของการผลิต FOS

เป็นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการในการผลิต ตั้งแต่การจัดหาปัจจัยการผลิต (inputs) ซึ่งได้แก่ ที่ดิน โรงเรือนและอุปกรณ์ แหล่งเงินทุน และแรงงาน จนเข้าสู่กระบวนการผลิต (process) ได้แก่ การจัดหาลำไย รวมไปถึงการหาความรู้จากแหล่งวิชาการ ตลอดจนได้ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ (outputs) ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลประเภทฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์ FOS จากน้ำเชื่อมลำไย โดยการคิดราคาผลิตภัณฑ์จะขึ้นอยู่กับคุณภาพของ FOS ที่ผลิตได้จากน้ำเชื่อมลำไย

3.4.2 การวิเคราะห์ผลตอบแทนจากการลงทุนและศึกษาศักยภาพเชิงพาณิชย์ของการผลิต FOS

3.4.2.1 ศึกษาเกี่ยวกับต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการผลิต ซึ่งสามารถแยกศึกษาเป็น 2 ประเภท คือ ต้นทุนเริ่มแรกและต้นทุนในการดำเนินการ และศึกษาผลตอบแทนของ FOS จากน้ำเชื่อมลำไย และโอกาสในการจัดจำหน่าย โดยภายใต้ขอบเขตของการดำเนินงานการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาด้านทุนและผลตอบแทนทางการเงินของ โครงการการสร้างสายการผลิตเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพฯ โดยเสนอต่อเนื่องจากกระบวนการในการทำงาน กระบวนการผลิตและปัญหาของการทำของสารสกัดจากลำไย เพื่อทราบถึงต้นทุนและผลตอบแทนทางการเงิน หลังจากนั้นสามารถนำข้อมูลต่าง ๆ มาวิเคราะห์และแปลผล โดยมีเทคนิคของงานวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) ส่วนแรก เป็นการสำรวจโดยการเก็บรวบรวมข้อมูลจากโครงการสารสกัดจากลำไย เป็นแบบสัมภาษณ์แบบมีโครงสร้าง เพื่อรวบรวมข้อมูล รวมไปถึงการใช้วิธีการสังเกต เพื่อเก็บข้อมูลในส่วนของคุณลักษณะของผู้ประกอบการและวิธีการดำเนินงาน

2) ส่วนที่สอง เป็นการศึกษาเกี่ยวกับต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการผลิต โดย ต้นทุนและค่าใช้จ่ายในการผลิต สามารถแยกศึกษาเป็น 2 ประเภท คือ ต้นทุนเริ่มแรก ซึ่งเป็น ค่าใช้จ่าย ประกอบด้วย ค่าที่ดิน, ค่าโรงเรือน และค่าวัสดุอุปกรณ์ ต้นทุนในการดำเนินการ เป็น ค่าใช้จ่าย ซึ่งได้จัดเป็นหมวดต่าง ๆ ได้แก่ ค่าลำไยคละเกรด, ค่าไฟฟ้า, ค่าน้ำประปา, ค่าแรงงาน, ค่าแช่แข็งลำไย, ค่าสารเคมีในการวิเคราะห์คุณภาพ, ค่าเอนไซม์, ค่าบำรุงรักษาระบบผลิตร้อยละ 5 ของเงินลงทุน และค่าดอกเบี้ยเงินกู้ร้อยละ 12

3.4.2.2 วิเคราะห์ต้นทุนและผลตอบแทนทางการเงินของ FOS จากน้ำเชื่อมลำไย ซึ่งวิเคราะห์โดย มูลค่าปัจจุบันสุทธิ อัตราผลตอบแทนภายในโครงการ อัตราส่วนผลตอบแทนต่อ ต้นทุน และความไวต่อเหตุเปลี่ยนแปลงของธุรกิจ

3.4.2.3 ทำการศึกษาพฤติกรรมของผู้บริโภค FOS จากน้ำเชื่อมลำไย โดย ทำการศึกษา รวบรวมข้อมูล ในการพัฒนาศักยภาพ และการตลาด ด้านผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะการแปรรูปลำไยเป็น FOS จากน้ำเชื่อมลำไยในเขตภาคเหนือตอนบน ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา และแม่ฮ่องสอน