

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการทดลอง

2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

2.1.1 รำข้าวสกตน้ำมัน บริษัท ไทยร่วมใจน้ำมันพืช จำกัด โดยรำข้าวมีปริมาณโปรตีน 17.99% (protein conversion factor เท่ากับ 6.25), ความชื้น 10%, ไฟเบอร์ (crude fiber) 17.22% และไขมันต่ำกว่า 1% ตามข้อมูลวิเคราะห์ของบริษัทผู้ผลิตรำข้าว

2.1.2 ลิกลินคราฟท์ (Raja engineering Co. Ltd., Bangkok, Thailand) ปริมาณลิกลิน 97% (ฐานแห้ง), ปริมาณความชื้น 5% อ้างอิงจากผู้ผลิต

2.1.3 สารเคมีจากบริษัท Carlo Erba (Rodano, Italy) J.T.Baker (Phillipsburg, USA) Roongsub Chemical Ltd, (New South Wales, Australia) Tecator (Höganäs, Sweden) แบบ AR Grade

2.2 วัสดุอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องชั่ง (Sartorius, Model LA230S, Goettingen, Germany)

2.2.2 เครื่องผสม (Mixer, King Mixer, Model K-05, USA)

2.2.3 เครื่องอัดรีด (Twin screw extruder, Model LTE-20-40, Labtech Engineering Co., Ltd., Thailand)

2.2.4 เครื่องอัดขึ้นรูป (Hydraulic Press Machine, Model 20 T., SMC TOYO METAL Co., Ltd., Thailand)

2.2.5 เครื่องวัด pH (pH meter, Schott Geräte, Model CG841, Mainz, Germany)

2.2.6 เครื่อง Shaking water bath, Heto, Model AT110, Allerod, Denmark

2.2.7 เครื่องแยกเหวี่ยง (Centrifuge, Himac, Model CR21, Chiba, Japan)

2.2.8 เครื่อง Ultrasonic, Model 2210, Soest, Netherland

2.2.9 เครื่อง High performance liquid chromatography system

- Pump, Waters, Model 600E, MA, USA- Auto sampler, Waters, model 717, MA, USA

- Tunable absorbance detector, Waters, model 486, MA, USA

- Fluorescence detector, Jasco, model FP290, Japan

2.2.10 เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer, Stable Micro System, TA-XT. plus, Surrey, UK)

2.2.11 เครื่อง Capillary rheometer (RHEO-TESTER 2000, Germany)

2.2.12 เครื่อง Thermal analyzer (Mettler Toledo, TGA/DSC 1 HT/1600/673/13555)

2.2.13 เครื่อง Controlled strain rheometer ARES (Rheometric Scientific, USA)

2.3 การวิเคราะห์สมบัติรำข้าวสกักน้ำมัน

เบื้องต้นวิเคราะห์สมบัติของรำข้าวสกักน้ำมัน ได้แก่ การกระจายขนาดของอนุภาคโดยใช้ตะแกรงขนาดต่างๆ และการสูญเสียน้ำหนักเมื่อได้รับความร้อน thermogravimetric analysis (TGA) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่อัตราการไหล 50 มิลลิลิตร/นาที่ อุณหภูมิ 25-800 องศาเซลเซียส ที่อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียส / นาที่ น้ำหนักของตัวอย่าง 7 มิลลิกรัม

นอกจากนี้วิเคราะห์โปรตีนของรำข้าวสกักน้ำมัน สกัดโดยใช้วิธีของ Osborne และ Campbell โดยแบ่งโปรตีนได้เป็น 4 ชนิดตามการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ได้แก่ น้ำ 5% NaCl, 0.1 M NaOH และ 70% ethanol โดยมีวิธีการสกัด [8] ดังนี้คือ นำรำข้าวสกักน้ำมันที่มีผ่านตะแกรงขนาด 70 เมช (270 ไมครอน) มาละลายในน้ำกลั่น พร้อมกวนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 3000g เป็นเวลา 30 นาที โดยส่วนใสที่ได้ คือ โปรตีน albumin นำส่วนที่ไม่ละลายสกัดด้วย 5% NaCl แล้วเหวี่ยงแยกส่วนใส ซึ่งเป็นโปรตีน globulin หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกันโดยใช้ 0.1 M NaOH เป็นตัวทำละลายซึ่งจะได้ glutelin สุดท้ายสกัดด้วย 70% ethanol ซึ่งจะได้โปรตีน prolamin โดยนำส่วนที่ได้มาตกตะกอนแยกโปรตีนที่ pH 4.1, 4.3, 4.8 และ 6.8 เพื่อตกตะกอนโปรตีน albumin, globulin, glutelin และ prolamin ตามลำดับ นำโปรตีนที่ตกตะกอนไปเหวี่ยงแยกที่ 3000g เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ทั้งนี้วิเคราะห์การกระจายขนาดของโปรตีนด้วยวิธี size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) เตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Redl *et al.* [9] ขึ้นแรงกดตัวอย่างให้เป็นผง พร้อมเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อช่วยในการบดตัวอย่าง หลังจากนั้นผสมแป้ง (starch) ปริมาณ 1 กรัม ต่อ 5 กรัม เพื่อช่วยดูดซับกลีเซอรอล นำตัวอย่างที่บดแล้ว (160 มิลลิกรัม) ใส่ในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate

buffer (pH 6.9) ปริมาณ 20 ml ที่มี 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) เขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 80 นาที นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่อง centrifuge (30 นาที 39 000 g และ 20 องศาเซลเซียส) นำส่วนใสซึ่งคือ โปรตีนที่ละลายได้ (SDS-soluble protein) ปริมาณ 20 μ l วิเคราะห์ด้วย SE-HPLC สำหรับส่วนที่เป็นตะกอน คือ โปรตีนที่ละลายไม่ได้ใน SDS นำตะกอนไปเติมสาร SDS-phosphate buffer 5 มิลลิลิตร ที่มี 20 mM dithioerythritol (DTE) เขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้ว sonicate เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตัดพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้ตะกอนละลายได้ นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่อง centrifuge (30 นาที 39 000 g และ 20 องศาเซลเซียส) หลังจากนั้นนำส่วนใสไปผสม กับสาร SDS-phosphate buffer ที่มี 40 mM iodoacetamide โดยผสมในสัดส่วนปริมาตรเดียวกัน เพื่อ alkylate thiol เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น นำสารละลายปริมาณ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์ด้วย SE-HPLC ที่ความยาวคลื่น 214 nm โดยใช้สาร 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) ที่มี 0.1% SDS ด้วยอัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตร/นาที

นอกจากนี้วิเคราะห์ viscoelastic ของโปรตีนรำข้าวผสมพลาสติกไซเซอร์ โดยสกัดโปรตีนจากรำข้าวด้วย ตัวทำละลาย pH 9 ปรับด้วย 2 M NaOH [10] พร้อมกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่อง centrifuge (30 นาที 9,000 g 25°C) นำส่วนไปปรับ pH เป็น 4 ด้วย 2 M HCl นำไปเหวี่ยงแยก (30 นาที 9,000 g 25°C) นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นนำโปรตีนที่ได้ไปผสมกับกลีเซอรอล 30% ด้วยเครื่องผสม แล้ว precondition ที่ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 0% โดยใช้ P_2O_5 เพื่อกำจัดความชื้นในตัวอย่าง หลังจากนั้นวิเคราะห์ viscoelastic โดยใช้เครื่อง Controlled strain rheometer ARES ด้วยหัวกดแบบ serrated parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ปรับช่องว่างความสูงของตัวอย่าง 1-1.2 มิลลิเมตร ทดสอบเบื้องต้นด้วย temperature sweep test ที่อุณหภูมิ 25-180 องศาเซลเซียส สำหรับสถานะที่ในการวิเคราะห์ storage modulus (G'), loss modulus (G'') และ $\tan \delta$ (G''/G') คือ ความถี่ที่ 6.28 rad/s 1 % strain ซึ่งอยู่ในช่วง viscoelastic และอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที [11]

2.4 การศึกษาผลของพลาสติกไซเซอร์ที่มีต่อการอัดรีดรำข้าวสกัดน้ำมัน

เตรียมตัวอย่างที่มีอัตราส่วนของรำข้าวสกัดน้ำมันและพลาสติกไซเซอร์ต่างกัน โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การผสม และการอัดรีดด้วยเครื่องอัดรีดแบบเกลียวคู่ (twin screw extruder)

(1) การเตรียมตัวอย่างก่อนการอัดรีด

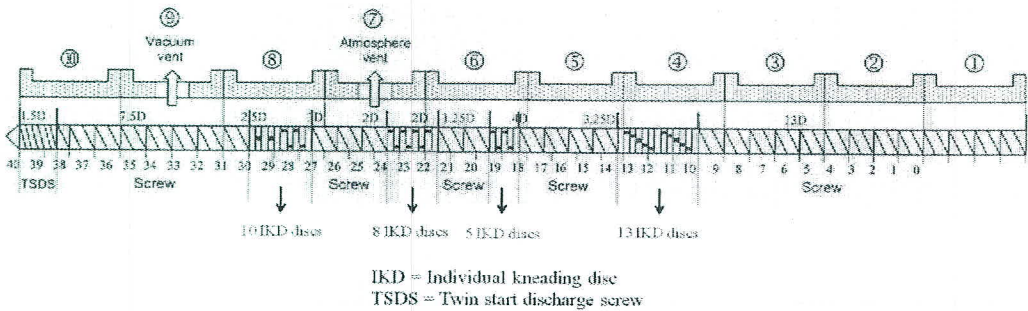
ในขั้นแรกเป็นการผสม โดยนำส่วนผสมต่าง ๆ มาผสมให้เข้ากัน โดยมีอัตราส่วนระหว่างรำข้าวสกัदन้ำมัน และพลาสติกไซเซอร์ ได้แก่ กลีเซอรอล และน้ำ ดังตารางที่ 2.1 ผสมด้วยเครื่องผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไป เก็บไว้ให้เข้าสู่สมดุลก่อนนำมาทำไปอัดรีด

ตารางที่ 2.1 อัตราส่วนของส่วนผสมของวัสดุที่ทำจากรำข้าวสกัदन้ำมันที่มีปริมาณลิกนินคราฟท์ 0-50%

ตัวอย่าง	องค์ประกอบ (%โดยน้ำหนัก)		
	กลีเซอรอล	น้ำ	รำข้าวสกัदन้ำมัน
G30:B70	30%	-	70%
W30:B70	-	30%	70%
G40:B60	40%	-	60%
W10:G30:B60	30%	10%	60%

(2) การอัดรีด (extrusion)

ขั้นตอนที่สอง นำตัวอย่างที่ผสมแล้วมาอัดรีดด้วยเครื่องอัดรีดแบบเกลียวคู่ (twin screw extruder) โดยใช้หัวดายชนิดวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะเกลียวของเครื่องอัดรีด (สัดส่วนของความยาว/เส้นผ่าศูนย์กลาง = 40) [12]

สภาวะการอัดรีดตัวอย่างที่อุณหภูมิอัดรีดแตกต่างกันที่อัตราการป้อนตัวอย่าง 1.5 กิโลกรัม/ชั่วโมง ความเร็วสกรู 50 รอบต่อนาที แสดงดังตารางที่ 2.2 ระหว่างกระบวนการอัดรีดบันทึกความดันหน้าตาย กระแสไฟของมอเตอร์ เวลาที่อยู่ในเครื่องอัดรีด (residence time) รวมทั้งลักษณะปรากฏของ extrudate

ตารางที่ 2.2 สภาวะการอัดรีดตัวอย่างที่อุณหภูมิอัดรีดแตกต่างกันที่อัตราการป้อนตัวอย่าง 1.5 กิโลกรัม/ชั่วโมง ความเร็วสกรู 50 รอบต่อนาที

อัตราการป้อน ตัวอย่าง (กิโลกรัม/ชั่วโมง)	ความเร็วสกรู (รอบต่อนาที m)	อุณหภูมิอัดรีด (องศาเซลเซียส)				
		อุณหภูมิบาร์เรล				อุณหภูมิ หน้าตาย โซน 9-10
		โซน 1-2	โซน 3-4	โซน 5-6	โซน 7-8	
2.5	50	60	70	80	90	100
		80	90	100	110	120
		110	120	130	140	150

2.5 การศึกษาผลของลิกนินกราฟที่มีต่อการอัดรีดรำข้าวสกัदन้ำมัน

สำหรับการศึกษามลของลิกนินกราฟที่มีต่อการอัดรีดรำข้าวสกัदन้ำมัน เตรียมตัวอย่างโดยนำส่วนผสมต่าง ๆ มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม โดยมีปริมาณลิกนินต่างกัน โดยมีอัตราส่วนหว่างรำข้าวสกัदन้ำมัน : ลิกนิน : กลีเซอรอล เท่ากับ 70: 0: 30 - 20: 50: 30 โดยน้ำหนัก ดังตารางที่ 2.3 ทำการผสมด้วยเครื่องผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ให้เข้าสู่สมดุลก่อนนำมาทำไปอัดรีด

ขั้นตอนที่สอง นำตัวอย่างที่ผสมแล้วมาอัดรีดด้วยเครื่องอัดรีดแบบเกลียวคู่ (twin screw extruder) โดยใช้หัวตายชนิดวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 2.1 สภาวะการอัดรีดตัวอย่างที่อุณหภูมิอัดรีดแตกต่างกันที่อัตราการป้อนตัวอย่าง 1.5 กิโลกรัม/ชั่วโมง ความเร็วสกรู 50 รอบต่อนาที แสดงดังตารางที่ 2.2 ระหว่างกระบวนการอัดรีดบันทึกความดันหน้าตาย กระแสไฟของมอเตอร์ เวลาที่อยู่ในเครื่องอัดรีด (residence time) รวมทั้งลักษณะปรากฏของ extrudate

ตารางที่ 2.3 อัตราส่วนของส่วนผสมของวัสดุที่ทำจากรำข้าวสกตน้ำมันที่มีปริมาณลิกนินคราฟท์ 0-50%

ตัวอย่าง	องค์ประกอบ (%โดยน้ำหนัก)		
	รำข้าวสกตน้ำมัน	ลิกนินคราฟท์	กลีเซอรอล
0%KL	70	0	30
10%KL	60	10	30
20%KL	50	20	30
30%KL	40	30	30

2.6 การศึกษาผลของลิกนินคราฟท์ที่มีต่อความหนืดของตัวอย่าง

วิเคราะห์สมบัติทางรีโอโลจี โดยวัดความหนืดของตัวอย่างด้วยเครื่อง capillary rheometer เพื่อศึกษาพฤติกรรมการไหลของของผสมรำข้าวสกตน้ำมันและลิกนินคราฟท์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการอัดฉีด

ในการวิเคราะห์สมบัติทางรีโอโลจีของตัวอย่าง ทำโดยนำตัวอย่างอัดรีดผสมรำข้าวสกตน้ำมัน ลิกนินคราฟท์ และกลีเซอรอล มาวิเคราะห์ความหนืดด้วยเครื่อง capillary rheometer ที่มีหน้าตายขนาด 2 มิลลิเมตร และความยาวต่อเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 15 ทดสอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในช่วงอัตราเฉือน 10 ถึง 3000 วินาที⁻¹ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนด้วยสมการ 2.1

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

(2.1)

โดย	η (Pa.s)	คือ	ความหนืด
	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	คือ	ที่อัตราเฉือน ($\dot{\gamma}$) เท่ากับ 1
	K (Pa.s ^{n})	คือ	ค่า consistency หมายถึง ความหนืดที่อัตราเฉือน ($\dot{\gamma}$) เท่ากับ 1 วินาที ⁻¹
	n	คือ	power-law index

2.7 การศึกษาสมบัติทางกลของวัสดุรำข้าวสกตน้ำมันผสมลิกนินคราฟท์

เตรียมวัสดุโดยตัวอย่างรำข้าวสกตน้ำมันผสมลิกนินจากการอัดรีดมาขึ้นรูปเป็นแผ่นด้วยวิธีการอัดด้วยความดัน (compression molding) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 150 บาร์

สมบัติทางกลเป็นสมบัติหนึ่งในการใช้งานของวัสดุ ในงานวิจัยนี้วิเคราะห์สมบัติทางกลของวัสดุด้วยการทดสอบแบบแรงดึง (tensile test) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) การทดลองทำโดยนำตัวอย่างที่ขึ้นรูปหนา 2.5 มิลลิเมตร มาตัดให้เป็นรูป dumb-bell ขนาดความยาว 11 เซนติเมตร ความกว้าง 7 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องอัด (Hydraulic Press Machine) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 53% โดยใช้สารละลายอิมิตัวของเกลือ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ จนตัวอย่างเข้าสู่สภาวะสมดุล

หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาวัดความหนาด้วยเวอร์เนีย (Vernier caliper) จำนวน 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยวิเคราะห์สมบัติทางกลโดยใช้ความเร็วในการดึงเท่ากับ 1 มิลลิเมตร/วินาที จำนวน 10 ซ้ำตัวอย่าง คำนวณค่าความเค้นดึง (tensile stress) จากอัตราส่วนระหว่างแรง (นิวตัน) ต่อพื้นที่หน้าตัดของตัวอย่าง (ตารางเมตร) ความเครียดคำนวณจากความยาวที่เปลี่ยนไปต่อความยาวเริ่มต้นของตัวอย่าง และค่ายังมอดูลัสคำนวณจากความชันในช่วงเส้นตรงของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นกับความเครียด