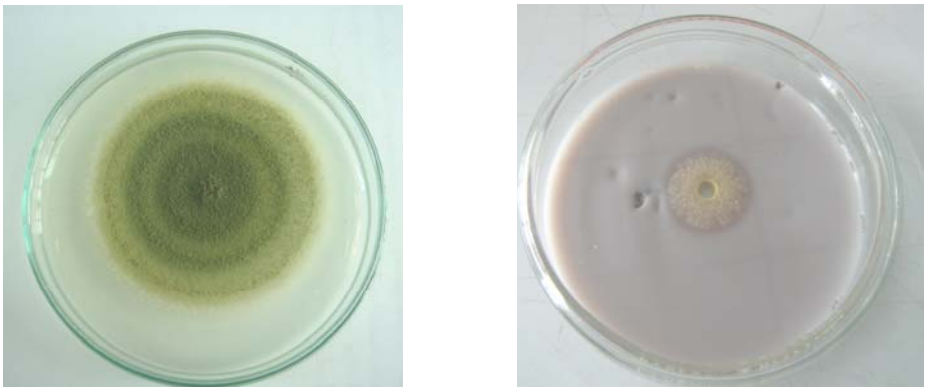
บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อรา *Aspergilus oryzae* (รูปที่ 3.1ก) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีในห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ โดยจากการวิจัยเบื้องต้นพบว่า เชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวในห้องปฏิบัติการฯ ที่สามารถย่อยสลายแทนนินได้โดยดูได้จากการเกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา (รูปที่ 3.1ข) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์แทนเนสได้

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเบื้องต้นจะเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นจะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งจะนำไปใช้งาน โดยควรถ่ายเชื้อทุกๆ เดือนลงบนอาหารแข็ง PDA ที่เตรียมใหม่



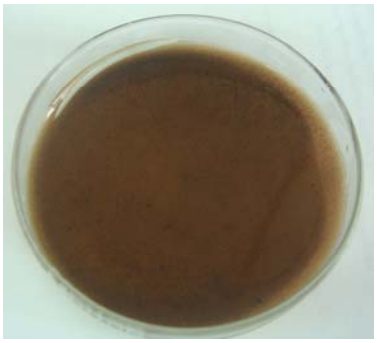
ก ข

รูปที่ 3.1 *Aspergillus oryzae*

3.1.2 อาหารแข็ง

อาหารแข็งที่ใช้ในงานวิจัยมี 2 ชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) (รูปที่ 3.2ก) และ Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดร้อยละ 2 (รูปที่ 3.2ข) โดย PDA เป็นอาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราเบื้องต้น ส่วน Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดฯ เป็นอาหารแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ถ่ายมาจากเชื้อราบนอาหาร PDA เพื่อผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการผลิตกรดแกลลิกต่อไป องค์ประกอบและวิธีเตรียมอาหารทั้งสองชนิดแสดงในภาคผนวก ข

ก



ข

รูปที่ 3.2 อาหารแข็ง
เมื่อ ก คือ PDA ข คือ Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดร้อยละ 2

3.1.3 อาหารเหลว

อาหารเหลวที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารละลายเกลือแร่โดยมีองค์ประกอบของอาหารในรูปของร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร ดังต่อไปนี้ โซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต และโพแทสเซียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.25, 0.10, 0.05 และ 0.05 ตามลำดับ (Manjit และคณะ, 2008)

3.1.4 กากกาแฟสด

กากกาแฟสดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านขายกาแฟสดในโรงอาหารของมหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์

3.1.5 สารเคมี

รายชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เอทานอลบริสุทธิ์ (C_2H_5OH)	BDH ANALAR
กรดอะซิติก (CH_3COOH)	BDH ANALAR
โปรตีน Bovine serum albumin (BSA)	FLUKA
กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	-
กรดแกลลิกโมโนไฮเดรต ($C_7H_6O_5.H_2O$)	FLUKA
ไอรอนคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$)	QREC
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$)	APS
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	MERCK
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	APS FINECHEM
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	APS
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟต (KH_2PO_4)	APS

3.1.5 **สารเคมี** (ต่อ)

รายชื่อสารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**
โพแทสเซียมไฮดร็อกไซด์ (KOH)	APS FINECHEM
โรดานีน ($C_3H_3NOS_2$)	FLUKA
โซเดียมอะซิเตต ($C_2H_3NaO_2$)	MERCK
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	AJAX FINECHEM
โซเดียมไฮดร็อกไซด์ (NaOH)	AJAX FINECHEM
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	AJAX FINECHEM
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS : $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$)	APS FINECHEM
กรดแทนนิก ($C_{76}H_{52}O_{46}$)	FLUKA
ไตรเอทาโนลามีน (TEA: $C_6H_{15}NO_3$)	AJAX FINECHEM
ทวีน 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$)	APS FINECHEM
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	APS FINECHEM

3.1.6 **อุปกรณ์ และเครื่องมือ**

รายชื่ออุปกรณ์และเครื่องมือ	**บริษัทผู้ผลิต**
เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
ไมโครปิเปตขนาด 50, 200 และ1000 ไมโครลิตร	BRAND
ตู้อบลมร้อน	MEMMERT
ตู้ถ่ายเชื้อรา	-
ฮีมาไซโตมิเตอร์	BOECO
หม้อนึ่งความดันไอสูง	HIRAYAMA
พีเอชมิเตอร์แบบมือถือ	HANNA
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	FORMA SCIENCTIFIC
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	SHIMADZU
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	MEMMERT
ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร	SCHOTT DURAN
เครื่องวิเคราะห์ความชื้น	-
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบตั้งโต๊ะ	UNIVERSAL 32

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. oryzae* โดยเชื้อราดังกล่าวจะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek Dox's minimal agar ที่เติมกากกาแฟสดร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเติมทวีน 80 ร้อยละ 0.01 ปริมาตรต่อปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร ขูดสปอร์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ทำการฆ่าเชื้อโดยเทคนิค Aseptic หลังจากนั้นใช้ไมโครปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสปอร์แขวนลอยไปนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ โดยให้มีความเข้มข้นของสปอร์ตั้งแต่ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ขึ้นไป (ภาคผนวก ก)

3.2.2 การเตรียมกากกาแฟสด

กากกาแฟสดจะถูกนำไปอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้สูญเสียปริมาณแทนนินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในกากกาแฟน้อยที่สุด โดยชั่งกากกาแฟสด 100 กรัม ใส่ถาดอะลูมิเนียมขนาด 20 X 30 เซนติเมตร (ให้กากกาแฟมีความหนาน้อยที่สุด) จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสม เมื่อได้กากกาแฟสดที่แห้งแล้ว จะเก็บรักษาไว้ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

3.2.3 กระบวนการผลิตกรดแกลลิก

ชั่งกากกาแฟอบแห้ง 5 กรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมชนิดของอาหารที่เหมาะสม (ข้อ 3.2.10) ลงไป 10 มิลลิลิตร ผสมอาหารให้เข้ากับกากกาแฟ จากนั้นปิดปากขวดด้วยสำลีและปิดด้วยกระดาษอะลูมิเนียมอีกชั้น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2) เป็นเวลา 4 วัน

3.2.4 การสกัดแทนนินจากกากกาแฟสด

การสกัดแทนนินจากกากกาแฟสดทำโดยชั่งกากกาแฟสดที่อบแห้งแล้วมา 0.5 กรัม ผสมกับเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และนำสารละลายที่ได้กรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (วิภา สุโรจนะเมธากุล และชิดชม ฮิรางะ, 2537)

3.2.5 การสกัดกรดแกลลิก

สกัดกรดแกลลิกที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการในข้อ 3.2.3 โดยการเติมเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร ในอัตราส่วน 7.5 มิลลิลิตรต่อกากกาแฟ 1 กรัม จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที กรองเอากากกาแฟออกโดยใช้ผ้าขาวบาง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 6 นาที (Shi และคณะ, 2003) เก็บสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิก

3.2.6 การวิเคราะห์กรดแกลลิก

กรดแกลลิกวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bajpai และ Patil (1996) โดยนำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.2.5 มาเจือจางลง 100 เท่า ด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254.6 และ 293.8 นาโนเมตร ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คำนวณได้จากสูตร 21.77 ($A_{254.6}$) – 17.17 ($A_{293.8}$)

3.2.7 การวิเคราะห์แอคติวิตี้เอนไซม์แทนเนส

แอคติวิตี้ของเอนไซม์แทนเนสวิเคราะห์ด้วยวิธีโรดานีน (Van de Lagemaat และ Pyle, 2001) โดยมีรายละเอียดดังนี้

(1) ผสมตัวอย่างเอนไซม์ 50 ไมโครลิตรกับสารละลายแทนนิก 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ข)

(2) นำสารละลายผสมในข้อ (1) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(3) หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร

(4) สารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ (blank) เตรียมได้โดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับสารละลายผสมในข้อ (1)

วิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายโรดานีนโดยมีรายละเอียดดังนี้

(1) ผสมสารละลายที่ได้จากข้อ (3) ในขั้นตอนของการวิเคราะห์แอคติวิตี้ฯ 100 ไมโครลิตรกับสารละลายโรดานีน [0.667% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเมทานอล] 150 ไมโครลิตร โดยผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

(2) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ 2.25 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

(3) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายกรดแทนนิกด้วยเอนไซม์แทนเนสจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงแอคติวิตี้ของเอนไซม์แทนเนส โดย *เอนไซม์แทนเนส 1 ยูนิต คือ ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อเวลาในการทำปฏิกิริยา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0*

กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้นแสดงในภาคผนวก ค

3.2.8 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

ปริมาณแทนนินในกากกาแฟสดวิเคราะห์โดยวิธีของ Haggerman และ Butler (1978) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

(1) ปิเปตสารละลายสกัดแทนนินที่ได้จากข้อ 3.2.4 มา 1 มิลลิลิตร (ห้ามมีอะซีโตนปนเปื้อน) และสารละลายโปรตีน BSA (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันทันที

(2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแทนนินที่สกัดได้จากพืช แต่หากเป็นแทนนินบริสุทธิ์ให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

(3) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูงสุดของเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ เป็นเวลา 15 นาที

(4) เทส่วนที่เป็นสารละลายทิ้งไป แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยการเติมสารละลาย SDS-TEA (ภาคผนวก ข) 4 มิลลิลิตร

(5) ปิเปตสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข) 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

(6) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

(7) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบ (blank) ซึ่งเตรียมได้โดยการผสมสารละลาย SDS-TEA กับ สารละลายเฟอริกคลอไรด์

กราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณแทนนินแสดงในภาคผนวก ค

3.2.9 การวิเคราะห์ความชื้นในกากกาแฟสด

ความชื้นในกากกาแฟสดวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น ซึ่งทำโดยชั่งกากกาแฟสดไม่เกิน 1 กรัม ลงบนถาดอะลูมิเนียมของเครื่องวิเคราะห์ความชื้น จากนั้นปิดฝาเครื่อง แล้วเครื่องจะดำเนินการระเหยน้ำที่มีอยู่ในกากกาแฟสด และรายงานผลออกมาอยู่ในรูปของ %ความชื้น

3.2.10 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งกากกาแฟสดได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้ง โดยอุณหภูมิที่ใช้ได้แก่ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการอบแห้งได้แก่ 1, 2 และ 3 วัน โดยใช้ตัวอย่าง 100 กรัม ใส่ถาดอะลูมิเนียมขนาด 20 X 30 เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ แล้วเก็บตัวอย่างกากกาแฟสดตามระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความชื้น และปริมาณแทนนิน

3.2.11 ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแกลลิก

ชนิดของอาหารที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ สารละลายเกลือแร่ (ภาคผนวก ข) น้ำก๊อก และน้ำกลั่น โดยใช้กระบวนการผลิตกรดแกลลิกดังข้อ 3.2.3 จากนั้นทำการสกัดกรดแกลลิก และนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น

3.2.12 ศึกษากระบวนการผลิตกรดแกลลิกที่เหมาะสม

กระบวนการผลิตกรดแกลลิกที่ศึกษา ได้แก่ การผลิตบนอาหารแข็ง (solid state fermentation : SSF) การผลิตในอาหารแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid state fermentation : semi-SSF) และการผลิตในอาหารเหลว (submerged fermentation : SmF) โดยใช้กากกาแฟสดอบแห้ง 5 กรัม ต่อปริมาตรอาหารที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.2.11 ดังนี้ SSF ใช้อาหาร 10 มิลลิลิตร Semi-SSF ใช้อาหาร 50 มิลลิลิตร และ SmF ใช้อาหาร 83 มิลลิลิตร ดำเนินการผลิตกรดแกลลิกดังข้อ 3.2.3 จากนั้นทำการสกัดกรดแกลลิก และนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น

3.2.13 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิกที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช อัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่เหมาะสม ความเร็วในการเขย่า และระยะเวลาในการผลิต โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) แบบ First- order models โดยใช้การจัดวางแบบ 2^n Factorial และมีสิ่งทดลองที่เป็นจุดกึ่งกลางของระดับในแต่ละปัจจัย (อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2550) แผนการทดลองดังกล่าวแสดงดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองแบบ 2^n Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง

สิ่งทดลองที่	Coded Variables	
	ปัจจัย A	**ปัจจัย B**
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	0	0

หมายเหตุ : เฉพาะสิ่งทดลองที่ 5 จะทำซ้ำอีก r ครั้ง ซึ่ง r จะมีค่าอย่างน้อยเท่ากับจำนวนปัจจัยที่ศึกษา

ที่มา : อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2550

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก จะทำการศึกษาทีละ 2 สภาวะ (ยกเว้นระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งจะศึกษาแยก) โดยใช้การวางแผนการทดลองข้างต้นดังนี้

(1) ศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับพีเอชที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยสร้างแผนการทดลองแบบ 2^n Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง ได้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3.2 แผนการทดลองการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

ปัจจัยที่ศึกษา		Coded Variables	
พีเอช	**อุณหภูมิ**	**พีเอช**	**อุณหภูมิ**
4.0	25	-1	-1
4.0	35	-1	1
6.0	25	1	-1
6.0	35	1	1
5.0	30	0	0
5.0	30	0	0
5.0	30	0	0
5.0	30	0	0
5.0	30	0	0

ดำเนินการผลิตกรดแกลลิกดังข้อ 3.2.3 จากนั้นทำการสกัดกรดแกลลิก และนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น

(2) ศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่เหมาะสม และความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

อัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้ง (กรัม) ต่อปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 5 : 60, 5 : 80 และ 5 : 100 สำหรับความเร็วในเขย่าที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 80, 120 และ 160 rpm โดยสร้างแผนการทดลองแบบ 2^n Factorial ที่ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง ได้ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แผนการทดลองการศึกษาอัตราส่วนของกากกาแฟสดอบแห้งต่อปริมาตรของอาหารที่เหมาะสม และความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

ปัจจัยที่ศึกษา		Coded Variables	
อัตราส่วนฯ	**ความเร็วในการเขย่า (rpm)**	**อัตราส่วนฯ**	**ความเร็วในการเขย่า**
5 : 60	80	-1	-1
5 : 60	160	-1	1
5 : 100	80	1	-1
5 : 100	160	1	1
5 : 80	120	0	0
5 : 80	120	0	0
5 : 80	120	0	0
5 : 80	120	0	0
5 : 80	120	0	0

ดำเนินการผลิตกรดแกลลิกดังข้อ 3.2.3 จากนั้นทำการสกัดกรดแกลลิก และนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น

(3) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแกลลิก

ระยะเวลาในการผลิตกรดแกลลิกที่ใช้ศึกษา คือ 0-7 วัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ในการศึกษา ดำเนินการผลิตกรดแกลลิกดังข้อ 3.2.3 จากนั้นทำการสกัดกรดแกลลิก และนำสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิกที่เกิดขึ้น

3.2.14 ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิก

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกรดแกลลิกได้ใช้วิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถของตัวอย่างในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (Cuendet และคณะ,1997) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ผสมตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้นร้อยละ 0.004 (ละลายในเมทานอล) 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดังนี้

ร้อยละของการยับยั้ง = $[(A_{blank} - A_{sample}) / A_{blank}] \times 100$

เมื่อ A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control (สารละลายผสมที่ไม่มีตัวอย่าง)

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดลองเพื่อใช้ในการสร้างสมการด้วยโปรแกรม Statistix version 7 (Analytical Software, Inc., Tallahassee, FL, USA) รวมถึงทุกๆ การทดลองจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และมีการวิเคราะห์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation ; SD) ของข้อมูลด้วยโปรแกรม Microsoft Excel