**บทที่ 3**

**วิธีการดำเนินงาน**

ในการทำวิจัยเรื่องศึกษาการแปรรูปเซลลูโลสจากธูปฤาษีในดินเค็มเพื่อผลิตภัณฑ์เส้นใยอาหารมีสารเคมี วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

* 1. **สารเคมี**

1. สารละลายกรดซัลฟิวริก (H2SO4)

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3. สารละลายกรดแอซิติก Acitic acid (CH3COOH)

4. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Hydrogenperoxide (H2O2)

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 20% (w/v)

6. เอทานอล Ethanol (C2 H6O) 95% (v/v)

7. สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO) 8-12.5% (v/v)

8. สารเร่งปฏิกิริยา (สารผสมระหว่าง Copper sulfate (CuSO4.5H2O) กับ Potassium

 Sulfate (K2SO4) ในอัตราส่วน 1:9)

9. Potassium hydrogen phthalate (C8H5KO4, AR grade)

10. Petroleum ether

11. ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein)

12. สกรีนเมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ (Screened methyl red indicator)

13. กรดบอริกความเข้มข้น (H3PO4) 4% (w/v)

14. เบนซีน (C6H6)

15. กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล (HCl)

16. เมทธิลเรด

**3.2 วัสดุอุปกรณ์**

1. กรวยกรอง

2. กระจกนาฬิกา

3. กระดาษกรอง

4. กระดาษฟอยล์

5. กระดาษลิตมัส

6. กระบอกตวง

7. ขวดปรับปริมาตร

8. ขวดรูปชมพู่

9. ครูซิเบิล (Fritted glass crucible)

10. ถ้วยกระเบื้อง

11. ถ้วยสำหรับเผาเถ้า (Porcelain dish)

12. ถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาปิด (Weighing bottle)

13. ที่คีบ

14. แท่งแก้ว

15. บีกเกอร์ 250 1000 มิลลิลิตร

16. ถุงซิปล็อค

17. หลอดย่อย (Digestion tube)

18. ชุดไทเทรต

19. เครื่องย่อย (Digestion apparatus)

20. เครื่องกลั่น (Distillation apparatus)

**3.3 เครื่องมือ**

1. Cellulose thimble, Thimble adapter, Thimble support

2. Service unit สำหรับจ่ายความร้อน

3. เครื่องกรองระบบสุญญากาศ

4. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. เครื่องทำน้ำเย็น (Cooling)

6. เครื่องปั่น

7. เครื่องสกัดเยื่อใย

8. เครื่องสกัดไขมัน (Extraction unit)

9. เครื่องสกัด B-811

10. เตาเผา (Muffle furnace)

11. เตาไฟฟ้า

12. โถดูดความชื้น (Desiccator)

13. ตะแกรงร่อนสารขนาด 45 mesh

14. ตู้อบชนิด Forced-air drying oven

15. ตู้ดูดควัน (Fume hood)

16. เครื่องย่อย (Block digestor)

17. ชุดเครื่องกลั่น (Distilling unit)

18. ตู้อบ (Oven)

19. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)

20. เครื่อง X-ray Diffractrometer : XRD

21. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

**3.4 วิธีการทดลอง**

 **3.4.1 การเตรียมตัวอย่างธูปฤาษี**

1) แบ่งตัวอย่างธูปฤาษีออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

 ส่วนของใบธูปฤาษีอ่อน

 ส่วนของโคนธูปฤาษีอ่อน

 ส่วนของใบธูปฤาษีแก่

 ส่วนของโคนธูปฤาษีแก่

 2) ทำความสะอาดด้วยน้ำ จากนั้นหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กขนาด 1x1 เซนติเมตร ผึ่งลมในที่อากาศถ่ายเทสะดวกโดยมีตะแกรงร่องด้านล่างแล้วพลิกกลับด้านของตัวอย่างธูปฤาษีทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

 3) นำตัวอย่างในแต่ละส่วนไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแห้ง 4) บดตัวอย่างให้ละเอียดโดยเครื่องปั่น และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 45 mesh

 5) นำส่วนที่ได้จากการร่อนเก็บใส่ถุงซิปล็อคเก็บที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติ และสกัดเซลลูโลสต่อไป

 **3.4.2 การสกัดเซลลูโลส**

1) ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ดังนี้

 1.1 ใบธูปฤาษีอ่อน 29.69 กรัม

 1.2 โคนธูปฤาษีอ่อน 38.10 กรัม

 1.3 ใบธูปฤาษีแก่ 29.45 กรัม

 1.4 โคนธูปฤาษีแก่ 38.02 กรัม

 2) เติมเอทานอล 90% (v/v) 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 55–60 องศาเซลเซียส คนสารเป็นระยะ เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไขมันจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้เครื่องกรองระบบสุญญากาศ และล้างด้วยน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

 3) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15% (w/w) 150 มิลลิลิตร แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) อุณหภูมิ 55–60 องศาเซลเซียส คนสารเป็นระยะ เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีนจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง โดยใช้เครื่องกรองระบบสุญญากาศและล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าสารที่ได้จะมีค่า pH เป็นกลาง ตรวจสอบโดยใช้กระดาษลิตมัส

 4) เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 12% (w/w) 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีน กรองโดยใช้เครื่องกรองระบบสุญญากาศและล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าสารที่ได้จะมีค่า pH เป็นกลาง ตรวจสอบโดยใช้กระดาษลิตมัส

 5) นำสารตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการในข้อ 4) มาเติมโซเดียมไฮโปไลด์ 8–12% (v/v) และกรดแอซิติกเข้มข้น โดยใช้อัตราส่วน 1:1 เวลา 45 นาที เพื่อฟอกสีของเซลลูโลส กรองและล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าสารที่ได้จะมีค่า pH เป็นกลาง นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

 **3.4.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี**

 **3.4.3.1 ความชื้น** (AOAC, 2000)

 1) ชั่งน้ำหนักถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาที่ล้างสะอาดและแห้งอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

 2) ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในถ้วยอบบันทึกน้ำหนักนำไปอบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นคำนวณ %ความชื้น ดังสมการ

%ความชื้น = (W1 – W2) x (100)

 น้ำหนักตัวอย่าง

%วัตถุแห้ง (Dry matter, DM) = 100 - (%ความชื้น)

W1 คือน้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

W2 คือน้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

 **3.4.3.2 ปริมาณเถ้า** (D 2866 - 94 Total Ash Content of Activated Carbon and D 2867-95 Moisture in Activated Carbon)

 1) ชั่งน้ำหนักถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาที่ล้างสะอาด และแห้งอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

 2) ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้ว ประมาณ 1 กรัม นำไปทำการเผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน

 3) นำตัวอย่างที่เผาไล่ควันแล้วไปเผาต่อในเตาเผา (Muffle furnace) อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง

 4) นำถ้วยออกมาใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นคำนวณ %เถ้า ดังสมการ

%เถ้า = (W2 – W1) x 100

 น้ำหนักตัวอย่าง

W1 คือน้ำหนักถ้วย

W2 คือน้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

 ปริมาณอินทรียวัตถุ (Organic matter, OM) คำนวณได้จากผลต่างระหว่างน้ำหนักตัวอย่างกับน้ำหนักเถ้า ดังนี้

%OM = 100 - (%ความชื้น) - (%เถ้า)

 **3.4.3.3 ปริมาณโปรตีน** (Model Kjeltec System 1002, Tecator, Sweden)

 1) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม (ถ้าตัวอย่างมีโปรตีนน้อยให้ใช้ตัวอย่างปริมาณมากขึ้น) โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ไม่มีสารไนโตรเจน (ใช้กระดาษกรอง Whatman 541) ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ในหลอดย่อยโปรตีน

2) หาปริมาณไนโตรเจนตามขั้นตอนดังนี้

2.1) ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

1) เติมสารเร่งรวม 5 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย (ตามปกติเมื่อเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปแล้วจุดเดือด (Boiling point) ของสารละลายจะเป็น 330 องศาเซลเซียสแต่เมื่อเติมสารเร่งจะทำให้จุดเดือดของสารละลายเพิ่มเป็น 400 องศาเซลเซียส

2) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร (ถ้าใช้ตัวอย่างมากกว่า 2 กรัมขึ้นไปให้เพิ่มกรดซัลฟูริกเข้มข้นอีกโดยเพิ่ม 10 มิลลิลิตรต่อกรัมของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น)

3) นำไปต้มบนเครื่องย่อยโดยในครั้งแรกให้ใช้ความร้อนต่ำ (350 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งเดือดแล้วจึงเพิ่มความร้อนให้สูงขึ้น (370 องศาเซลเซียส) ถ้าสารละลายเดือดเร็วเกินไปให้ปิดไฟสัก 5 นาที แล้วค่อยเปิดใหม่จนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยโปรตีนมีสีเขียวใสปิดไฟเอาหลอดย่อยออกจากเครื่องย่อยแล้วทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเติมน้ำกลั่นอีกเล็กน้อยต้มต่อไปอีก 2 นาทีเพื่อทำลายกรดซัลฟูริกที่อาจเกิดขึ้น

2.2) ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

1) เตรียมกรดบอริกใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วหยดอินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริก 2–3 หยด ต่อจากนั้นนำไปวางที่เครื่องกลั่นโปรตีนโดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นของเครื่องกลั่นโปรตีนจุ่มอยู่ในกรดบอริก

2) ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่น

2.3) ขั้นตอนการไทเทรต (Titration)

1) นำขวดรูปชมพู่ (จากขั้นตอนการกลั่น) ไปไทเทรตด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (End point) หากใช้เมทธิลเรดเป็น อินดิเคเตอร์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน แต่หากใช้อินดิเคเตอร์รวมสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อนหรือใช้ด่างมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) ไทเทรตแต่ควรใช้อินดิเคเตอร์รวมดูจุดยุติจะสังเกตสีได้ชัดเจน

2) จดปริมาตรกรดหรือด่างไว้เพื่อคำนวณต่อไป

**หมายเหตุ** ในการวิเคราะห์โปรตีนแต่ละครั้งควรทำตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ (Blank) ด้วยโดยไม่มีตัวอย่าง ส่วนสารเคมีใส่เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การคำนวณ (เมื่อใช้กรดเกลือไทเทรต)

%โปรตีน = 1.4 (V1 – V2) N x 6.25

 W

V1 คือปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

V2 คือปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N คือเป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W คือน้ำหนักตัวอย่างอาหาร (กรัม)

 **3.4.3.4 ปริมาณไขมัน** (Model TFE 2000, Leco, USA) โดยใช้เครื่อง buchi

1) ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดขนาด 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1–2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงใน Cellulose thimble

 2) นำ Thimble ที่มีตัวอย่างไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

 3) นำถ้วยเปล่าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำออกมาปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งบันทึกน้ำหนัก

 4) ทำการ warm เครื่องสกัดโดยเปิดสวิทช์เครื่องจ่ายความร้อนซึ่งตั้งอุณหภูมิประมาณ 85–90 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20 นาที หรือรอจนอุณหภูมิสูงไว้ตามที่กำหนดในขณะเดียวกันทำการ warm เครื่องทำความเย็น ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส นำ Thimble ที่มีตัวอย่างติดกับ Thimble adapter วางลงใน thimble Support จากนั้นนำเข้าในเครื่องสกัดไขมันพร้อมทั้งเปิดสวิทช์ปั๊มน้ำที่เครื่องทำน้ำเย็น

 5) ตวง Petroleum ether ประมาณ 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้ววางลงใน cup holders นำเข้าเครื่องสกัด

 6) กดล็อคคานของเครื่องสกัดให้แน่นเปิดวาล์วให้สารสกัดไหลเวียนทำการต้มตัวอย่างกับสารสกัดโดยเลื่อนคันโยกตัวอย่างไปไว้ที่ตำแหน่ง boiling นาน 30 นาที จากนั้นทำการสกัดโดยเลื่อนคันโยกตัวอย่างไปไว้ที่ตำแหน่ง rinsing นาน 60 นาที ระยะเวลาการต้ม และการสกัดขึ้นอยู่กับประเภทตัวอย่างหากเป็นตัวอย่างที่มีไขมันสูงให้ใช้เวลานานขึ้นโดยปกติแนะนำให้ใช้เวลาต้มกับเวลาสกัดในอัตราส่วน 1:2

 7) เมื่อครบเวลาให้ทำการปิดวาล์วเก็บสารสกัดนานประมาณ 10 นาที หรืออาจช่วยให้สารสกัดระเหยเร็วขึ้นโดยเปิดวาล์วลดความดันที่เครื่องสกัดก่อนแล้วจึงเปิดสวิทช์ aspirator ที่เครื่องจ่ายความร้อน

 8) หลังจากทำการระเหยสารสกัดออกจากถ้วยแล้วทำการปลดล็อคคานที่เครื่องสกัดนำ cup holders ออกจากเครื่องนำถ้วยที่มีสารสกัดไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งบันทึกน้ำหนัก

 9) ถ้าสกัดไขมันหลายรอบต่อวันรอบที่ 2 ควรใส่ petroleum ether ในถ้วยประมาณ 15-20 มิลลิลิตรคำนวณดังสมการ

%ไขมัน = (W3 – W2) x 100

 W1

W1 คือน้ำหนักตัวอย่าง

W2 คือน้ำหนักถ้วย

W3 คือน้ำหนักถ้วย + น้ำหนักไขมัน

 **3.4.3.5 ปริมาณเยื่อใยหยาบ** (AOAC, 1990)

 1) นำตัวอย่างที่สกัดไขมันออกถ่ายลงใน beaker สกัดเยื่อใย

 2) ตวงสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.25% (v/v) ประมาณ 200 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องสกัดเยื่อใย จับเวลา 30 นาที

 3) เมื่อครบเวลา ดูด–เป่า สารละลายกรดซัลฟิวริกออกจากสารตัวอย่างล้างด้วยน้ำร้อนประมาณ 1 ลิตร

 4) ตวงสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25% (w/v) ที่อุ่นไว้ประมาณ 200 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องสกัดเยื่อใยสกัดต่อเป็นเวลา 30 นาที

 5) เมื่อครบเวลา ดูด–เป่า สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกจากสารตัวอย่างและล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนหมดด่างจะใช้น้ำร้อนประมาณ 1,500 มิลลิลิตรนำ beaker ที่มีเยื่อใยที่ไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ beaker ออกมาใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นจากนั้นชั่งน้ำหนักจดบันทึก

 6) นำ beaker ที่ชั่งน้ำหนักแล้วเข้าในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาเตาเผารอให้ถ้วยมีอุณหภูมิลดลงประมาณ 150-200 องศาเซลเซียส แล้วนำใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก beaker จดบันทึก (โดยส่วนของเยื่อใยคือส่วนที่ถูกเผาหายไป) จากนั้นคำนวณ %เยื่อใย ดังสมการ

%เยื่อใย = (W2 – W3) x 100

 W1

W1 คือน้ำหนักตัวอย่าง

W2 คือน้ำหนักbeaker + น้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ

W3 คือน้ำหนักbeaker + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

 **3.4.3.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต** (AOAC, 1990)

 การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่ายโดยการคำนวณจาก

%NFE = 100-[%Moisture + %Ash+ %CP + %EE + %CF]

 เมื่อ %Moisture = เปอร์เซ็นต์ความชื้น

 %Ash = เปอร์เซ็นต์เถ้า

 %CP = เปอร์เซ็นต์โปรตีนหยาบ

 %EE = เปอร์เซ็นต์ไขมันหยาบ

 %CF = เปอร์เซ็นต์เยื่อใยหยาบ

 **3.4.3.7 ปริมาณสารอินทรีย์**

การเตรียมสารตัวอย่างก่อนการหาปริมาณโฮโลเซลลูโลส และหาปริมาณลิกนิน

 1) ชั่งน้ำหนักที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างธูปฤาษี และผ่านการสกัดเซลลูโลสในข้อที่ 3.4.1 และ 3.4.2 อย่างละ 8 กรัม จากนั้นนำสารที่ผ่านการชั่งไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง

 2) นำไปสกัด โดยวิธีการ Soxhlet warm โดยใส่สารที่ชั่งไว้ลงไปใน Cellulose thimble และใช้ตัวทำละลายเป็น เอทานอล: เบนซีน ในอัตราส่วน 64: 137 จากนั้นกำหนดให้เครื่องสกัด B-811 4 รอบ ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

 3) สกัดต่อด้วย เอทานอล เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง และนำสารที่อยู่ใน Cellulose thimble ออกล้างด้วย เอทานอล 100 มิลลิลิตร ผ่านเครื่องกรองระบบสุญญากาศ

 4) นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2) และ 3) ของสารแต่ละชนิดไปกลั่นระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) จากนั้นนำสารที่ได้จากเครื่องกลั่นระเหยไปอบที่อุณหภูมิ 105$\pm $2 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักคำนวณ % สารอินทรีย์ดังสมการ

%สารอินทรีย์ = (W3 – W2) x 100

 W1

 W1 คือน้ำหนักตัวอย่าง

 W2 คือน้ำหนักขวด kjeldahl เปล่า

 W3 คือน้ำหนักขวด kjeldahl + ตัวอย่างที่ผ่านการกลั่นและอบ

 5) จากข้อ 3) ล้างสารที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผ่านเครื่องกรองระบบสุญญากาศ จากนั้นนำสารที่อยู่บนกระดาษกรองใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

 6) นำมากรองผ่านเครื่องกรองระบบสุญญากาศ และล้างสารที่ได้ด้วยน้ำร้อน 500มิลลิลิตร จากนั้นผึ่งให้แห้ง และชั่งน้ำหนัก ทำเช่นนี้กับสารตัวอย่างที่ได้กล่าวไปในข้างต้น อีก 7 ชนิดที่เหลือ และเก็บสารตัวอย่างที่ได้เพื่อหาปริมาณโฮโลเซลลูโลสต่อไปตามวิธีการ: T 204 Om88

 **3.4.3.8 ปริมาณโฮโลเซลลูโลส** (Zobel et al., 1996)

 1) ชั่งสารที่ได้จากการเตรียมหนัก 0.7$\pm $0.05 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขวด 250 มิลลิลิตร

 2) เติมสารละลายกรดแอซิติกเข้มข้น 0.6% (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.02% (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 20% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกนาฬิกา

 3) แกว่งเป็นวงไปมาสม่ำเสมอทุกๆ 15 นาที ใน Water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิ 70$\pm $2 องศาเซลเซียส โดยทุกๆ 1 ชั่วโมง ให้เติมสารละลาย NaClO อีก 1 มิลลิลิตร แกว่งสม่ำเสมอ รวมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ใน Water bath เมื่อครบเวลานำขวดรูปชมพู่ออกมาวางในอ่างน้ำแข็งจนสารละลายอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส

 4) นำสารตัวอย่างมากรองผ่าน sinter glass เบอร์ 3 ล้างด้วยสารละลายกรดแอซิ-ติก 100 มิลลิลิตร ไม่ใช้ suction และล้างต่อด้วย acetone ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วต่อ suction จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ทำการคำนวณดังสมการ

%Holocellulose **=** (W3 – W2) x 100

 W1

W1 คือน้ำหนักตัวอย่าง

 W2 คือน้ำหนัก sinter glass crucible เปล่า

 W3 คือน้ำหนัก sinter glass crucible + ตัวอย่างที่ผ่านอบจนน้ำหนักคงที่

  **3.4.3.9** ปริมาณ$ α $**– cellulose (T 204 Om88)**

 1) วาง sinter glass crucible ลงใน dish ที่มีน้ำสูง 1 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% (w/w) หรือ 5.21 N ปริมาตร 3 มิลลิลิตรคนด้วยแท่งแก้ว นาน 5 นาที

 2) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% (w/w) หรือ 5.21 N ปริมาตร 3 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้ว และตั้งทิ้งไว้ นาน 35 นาที ต่อมาเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร แล้วต่อด้วยsinter glass crucible เข้ากับ suction เติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ตามด้วย acetone 10 มิลลิลิตร

 3) นำตัวอย่างที่อยู่ใน sinter glass crucible ไปอบที่ตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนังคงที่ โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณดังสมการ

%$α$–cellulose **=**  (W3 – W2) x 100

 W1

 W1 คือตัวอย่างที่ผ่านอบจนน้ำหนักคงที่ จากการหา Holocellulose

 W2 คือน้ำหนัก sinter glass crucible เปล่า

 W3 คือน้ำหนัก sinter glass crucible + ตัวอย่างที่ผ่านอบจนน้ำหนักคงที่

 **3.4.3.10 ปริมาณลิกนิน** (T 204 Om88)

 1) ชั่งสาร 1.00$\pm $0.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H2SO4 conc.) 72% (v/v) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยสารละลายจะต้องมีอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส จากนั้นคนด้วยแท่งแก้วให้เส้นใยกระจาย ปิดด้วยกระจกนาฬิกา

 2) วางบีกเกอร์ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 20$\pm $1 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยคนสารตัวอย่าง อย่างสม่ำเสมอทุกๆ 15 นาที

 3) เทสารละลายใส่ขวดรูปชมพู่ 1,000 มิลลิลิตรปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่น 560 มิลลิลิตร เพื่อลดสภาพความเป็นกรดของซัลฟูริก ให้เหลือเพียง 3% (w/w)

 4) นำไปต้มให้เดือดนาน 4 ชั่วโมง รักษาระดับน้ำให้คงที่ โดยเติมน้ำกลั่นเป็นระยะๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ให้ Lignin ตกตะกอนลงมา

 5) กรองผ่าน Sinter glass เบอร์ 3 ล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่คำนวณดังสมการ

%Lignin = (W3 – W2) x 100

 W1

 W1 คือสารตัวอย่างที่เตรียมหาปริมาณลิกนิน

 W2 คือน้ำหนักsinter Glass crucible เปล่า

 W3 คือน้ำหนัก sinter Glass crucible + ตัวอย่างที่ผ่านอบจนน้ำหนักคงที่

**3.4.4 การศึกษาความบริสุทธิ์ของเซลลูโลสที่เตรียมได้**

ศึกษาโครงสร้างผลึกด้วย X-ray Diffractrometer : XRD

**3.4.5 การศึกษาสูตรอาหาร**

**3.4.5.1 วัตถุดิบและอัตราส่วนสำหรับการทำเต้าฮวยนมสด**

 1) ส่วนผสมในการทำตัวเต้าฮวย

น้ำสะอาด 1 ถ้วยตวง
นมสดจืด 1 ถ้วยตวง
นมข้นจืด 1 ถ้วยตวง
นมข้นหวาน 7-8 ช้อนโต๊ะ
ผงวุ้น 1 ช้อนชา

ผงเซลลูโลสจากธูปฤาษีที่ได้จากการสกัด ปริมาณ 1 2 และ 3 กรัม

 2) ส่วนผสมการทำน้ำราดเต้าฮวย

นมสดจืด 1/2 ถ้วยตวง
นมข้นจืด 1/2 ถ้วยตวง
นมข้นหวาน 1/2 ถ้วยตวง

**3.4.5.2 วิธีการทำเต้าฮวยนมสด**

1) ตั้งน้ำให้ร้อนเติมนมสดจืด นมข้นจืด และนมข้นหวานตามอัตราส่วนผสมให้เข้ากันและเติมผงวุ้นลงในหม้อ จากนั้นคนให้เข้ากัน โดยใช้ไฟอ่อน ระหว่างนี้จะต้องคนอยู่เสมอ นาน 10 นาที

2) พักไว้ให้พออุ่นๆ นำมากรองด้วยกระชอนตาถี่ จากนั้นเทใส่ถ้วยพลาสติก นำไปแช่เย็น 30 นาที

3) ทำในส่วนของน้ำราดเต้าฮวย โดยนำนมข้นหวานนมข้นจืดเติมลงผสมในนมสดจืด คนให้เข้ากัน

4) นำเต้าฮวยที่อยู่ในถ้วยพลาสติกมา เติมผลไม้ขนาดเท่าลูกเต๋าเช่น เงาะ มะละกอและสับปะรด เป็นต้น และเติมน้ำราดเต้าฮวยปิดฝานำเข้าตู้เย็นเพื่อรอการรับประทานต่อไป