บทที่ 4

ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ คือ คาร์โบไฮเดรตและไฟเบอร์ มีปริมาณร้อยละเฉลี่ย 66.22 และ 15.26 โดยน้ำหนักตามลำดับ ปริมาณที่วิเคราะห์ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ของ จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน (2525) ซึ่งรายงานไว้ว่า กากมันสำปะหลังมีแป้งเป็นองค์ประกอบร้อยละ 59.77 และ สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส (2530) ได้รายงานไว้ว่ากากมันสำปะหลังมีคาร์โบไฮเดรตและไฟเบอร์เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 48.72 - 70.50 และ 12.15 - 24.13 ตามลำดับ และพบว่าสถานที่เพาะปลูกมีผลต่อปริมาณองค์ประกอบต่าง ๆ

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของกากมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์	ปริมาณร้อยละเฉลี่ย (โดยน้ำหนัก)
ความชื้น	12.24 ± 0.27
โปรตีน	3.39 ± 0.04
ไขมัน	0.24 ± 0.15
ไฟเบอร์	15.26 ± 0.08
เถ้า	2.65 ± 0.02
คาร์โบไฮเดรต	66.22

ผลจากการวิเคราะห์ พบว่าคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในกากมันสำปะหลัง จึงเป็นแรงจูงใจที่จะทำการศึกษาและวิจัยเพื่อนำกากมันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์

ให้คุ้มค่า โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น แอลกอฮอล์ กรดซิตริก ผงชูรส ซอร์บิทอล อุตสาหกรรมการผลิตยาต่าง ๆ และเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น การผลิตกลูโคสจากกากมันสำปะหลัง จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรทางหนึ่ง

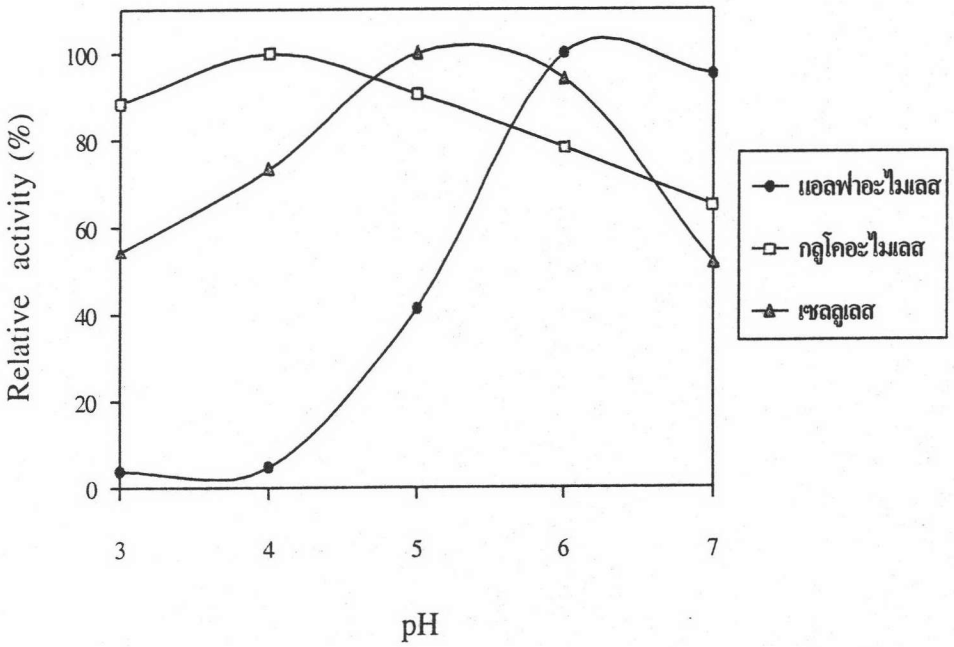
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์

เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย คือ กากมันสำปะหลัง ความบริสุทธิ์ไม่เท่ากับสับสเตรทที่ใช้ตามปกติ คือแป้ง ซึ่งอาจจะทำให้ภาวะที่เหมาะสมเปลี่ยนแปลงไปได้ จึงทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยโดยเอนไซม์ เพื่อศึกษาว่าผลขององค์ประกอบอื่นมีผลต่อค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมหรือไม่ และทำเพื่อที่จะหาว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิใดที่เหมาะสมที่สุด ถ้าจะนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส มาทำงานร่วมกัน

2.1 ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์แต่ละชนิด

2.1.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Tenase® L - 340)

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 13,600 MWU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15 ,ตารางที่ 4 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3 ถึง 4 ไม่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 0.071 ± 0.001 เป็น 0.862 ± 0.013 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นจาก 4 เป็น 5 และในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 6 ถึง 7 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดในการย่อย คือ ความเป็นกรดด่าง 6 ถึง 7 ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.518 ± 0.084 และ 1.446 ± 0.056 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การที่การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ขึ้นอยู่กับค่า



รูปที่ 15 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์ที่ภาวะ :

ปริมาณกากมันสำปะหลัง	60	มิลลิกรัม
อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	13,600	MWU ต่อกรัม
อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	10	DU ต่อกรัม
อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง	60	NCU ต่อกรัม
อุณหภูมิ	30	องศาเซลเซียส
เวลาในการย่อย	1	ชั่วโมง

หมายเหตุ :

Relative activity 100 % ของเอนไซม์

- แอลฟาอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.518 ± 0.084 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลูโคอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 6.146 ± 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เซลลูเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.173 ± 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์

ค่าความเป็นกรดด่าง	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ (mg/ml) โดยเอนไซม์		
	แอลฟาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	เซลลูเลส
3	0.058 ^{c} ± 0.006	5.449 ^{c} ± 0.200	0.094 ^{c} ± 0.003
4	0.071 ^{c} ± 0.001	6.146 ^{a} ± 0.118	0.127 ^{b} ± 0.018
4.5	ND	5.832 ^{b} ± 0.044	ND
5	0.862 ^{b} ± 0.013	5.568 ^{c} ± 0.210	0.173 ^{a} ± 0.007
6	1.518 ^{a} ± 0.084	4.809 ^{d} ± 0.011	0.163 ^{a} ± 0.005
7	1.446 ^{a} ± 0.056	3.989 ^{e} ± 0.086	0.090 ^{c} ± 0.016

a,b,c... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในคอลัมม์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ND = No data

ความเป็นกรดด่าง เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างกันมีผลทำให้กรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มีการแตกตัวของอิออนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมต่อการจับกันของเอนไซม์และสับสเตรทแตกต่างกัน (Segel, 1976)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอลฟาอะไมเลส (Tenase® L - 340) จากเชื้อ Bacillus subtilis ย่อยกากมันสำปะหลังได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6 ถึง 7 มีค่าเท่ากับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง (Solvey, 1993) และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์นี้ คือ 6 (ตารางที่ 4)

2.1.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Diazyme® L - 300)

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของ กลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 10 DU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15, ตารางที่ 4 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 5.449 ± 0.200 เป็น 6.146 ± 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 4 และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4 ความเข้มข้นของน้ำตาลน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3, 4.5, 5, 6 และ 7 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างที่สามารถย่อยกากมันสำปะหลังได้ดี คือ ความเป็นกรดด่าง 4 ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 6.146 ± 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลูโคอะไมเลส (Diazyme® L - 300) จากเชื้อ Aspergillus niger มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์นี้คือ 4.0 (ตารางที่4) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง คือ 4.0 ถึง 4.4 (Solvey, 1993)

2.1.3 ผลของความเป็นกรดด่างต่อการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยเอนไซม์เซลลูเลส (Celluclast® 1.5 L)

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง 60 NCU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15, ตารางที่ 4 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 0.094 ± 0.003 เป็น 0.173 ± 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นจาก 3 เป็น 5 และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 ถึง 6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีค่าสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3, 4 และ 7 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลลูเลส (celluclast® 1.5 L) จากเชื้อ Trichoderma reesei ย่อยกากมันสำปะหลังได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 ถึง 6 และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์นี้คือ 5 (ตารางที่ 4) มีค่าใกล้

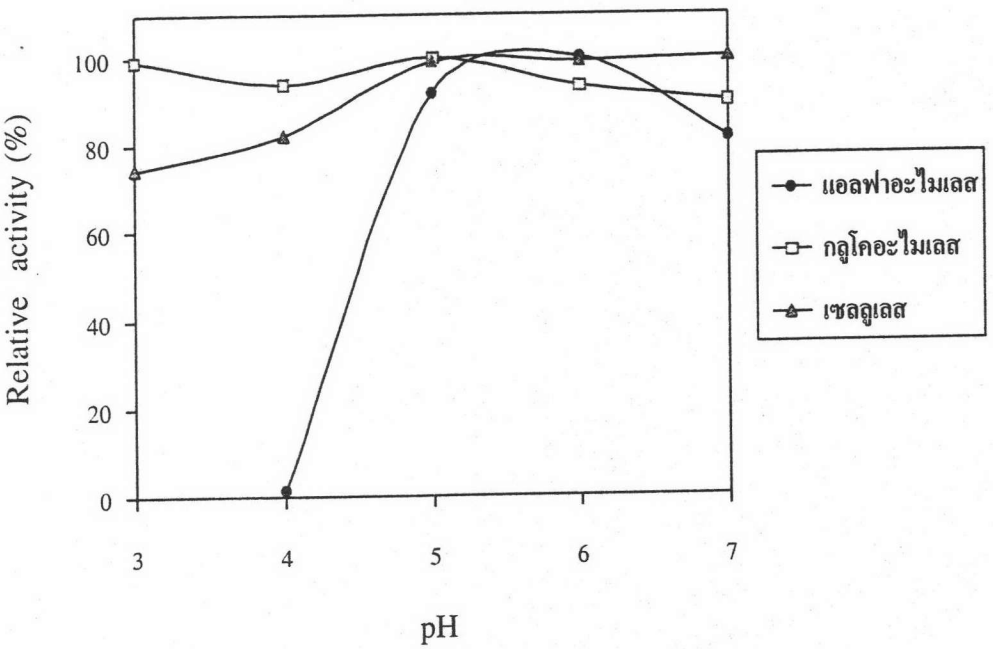
เดียงกับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อย carboxy methyl cellulose คือ 4.8(Novo, Nordisk, 1993)

จากผลการทดลองค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส พบว่าถ้าจะนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน ควรทำที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ถึง 6.0

2.2 ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

2.2.1 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการบ่มไว้ก่อนที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 13,600 MWU ต่อกรัม พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5, 6 มีค่าสูง (ตารางที่ 5 และภาคผนวก ค.) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ผลิตได้เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.098 $\pm$ 0.038 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม และนำมาวัดแอคติวิตีที่ความเป็นกรดด่าง 6.0 เช่นกัน พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.518 $\pm$ 0.084 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) เมื่อนำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาคำนวณร้อยละแอคติวิตีที่เหลือ(% activity left) (ภาคผนวก ง.) พบว่า เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ร้อยละ 72.33 เมื่อสังเกตจากกราฟ (รูปที่ 16) เส้นกราฟที่ความเป็นกรดด่าง 5 ถึง 7 ไม่เป็นเส้นตรง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต้องการ cofactor คือ Ca^{++} ซึ่งปราณี อ่านเปรื่อง (2535) กล่าวว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะมีความคงทนต่อความเป็นกรดด่างที่ภาวะที่มี Ca^{++} อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างกว้างกว่าภาวะที่ไม่มี Ca^{++}



รูปที่ 16 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซมในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ที่ภาวะ :

ปริมาณกากมันสำปะหลัง	60	มิลลิกรัม
อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	13,600	MWU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	6.0	
อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	10	DU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	4.0	
อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง	60	NCU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	5.0	
อุณหภูมิ	30	องศาเซลเซียส
เวลาในการย่อย	1	ชั่วโมง

หมายเหตุ :

Relative activity 100 % ของเอนไซม์

- แอลฟาอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.098 ± 0.038 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลูโคอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 4.606 ± 0.032 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เซลลูเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.113 ± 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 5 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ค่าความเป็นกรดด่าง	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ (mg/ml) โดยเอนไซม์		
	แอลฟาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	เซลลูเลส
3	ND	$4.606^{a} \pm 0.032$	$0.084^{c} \pm 0.003$
4	$0.016^{d} \pm 0.009$	$4.351^{ab} \pm 0.257$	$0.093^{b} \pm 0.001$
5	$1.008^{b} \pm 0.038$	$4.637^{a} \pm 0.173$	$0.112^{a} \pm 0.007$
6	$1.098^{a} \pm 0.038$	$4.333^{ab} \pm 0.116$	$0.112^{a} \pm 0.003$
7	$0.895^{c} \pm 0.038$	$4.163^{b} \pm 0.310$	$0.113^{a} \pm 0.005$

a,b,c... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในคอลัมม์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ND = No data

การที่ความเป็นกรดด่างมีผลต่อความคงทนของเอนไซม์ เนื่องจากความเป็นกรดด่างมีผลทำให้โครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์ในระดับ 2, 3 และ/หรือ 4 เปลี่ยนไป จนอาจทำให้โปรตีนของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Tenase® L-340) ยังมีความคงทนต่อความเป็นกรดด่างที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5 ถึง 7

2.2.2 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผ่านการบ่มไว้ก่อนที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยที่ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน

1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 10 DU ต่อกรัม (รูปที่ 16, ตารางที่ 5 และภาคผนวก ค.) พบว่าการบ่มเอนไซม์กลูโคอะไมเลสไว้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3 ถึง 7 มีผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีความคงทนต่อความเป็นกรดด่างในช่วงที่กว้างมาก ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ผลิตได้เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 4.315 ± 0.257 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม และนำมาวัดแอคติวิตีที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 เช่นกัน พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 6.146 ± 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) เมื่อนำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาคำนวณร้อยละแอคติวิตีที่เหลือ (% activity left) (ภาคผนวก ง.) พบว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ร้อยละ 70.79

2.2.3 ผลของความเป็นกรดด่างต่อความคงทนของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

เมื่อย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการบ่มไว้ก่อนที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยที่ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง 60 NCU ต่อกรัม (รูปที่ 16, ตารางที่ 5 และภาคผนวก ค.) พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสไม่คงทนที่ความเป็นกรดด่าง 3 ถึง 4 เมื่อความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น ในช่วง 5 ถึง 7 ความคงทนของเอนไซม์จะสูงขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ผลิตได้เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.112 ± 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อใช้เอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม และนำมาวัดแอคติวิตีที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 เช่นกัน พบว่าผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.173 ± 0.007 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) เมื่อนำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มาคำนวณร้อยละแอคติวิตีที่เหลือ(% activity left) (ภาคผนวก ง.) พบว่า เอนไซม์เซลลูเลสเมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีแอคติวิตีเหลือกยู่ร้อยละ 64.74

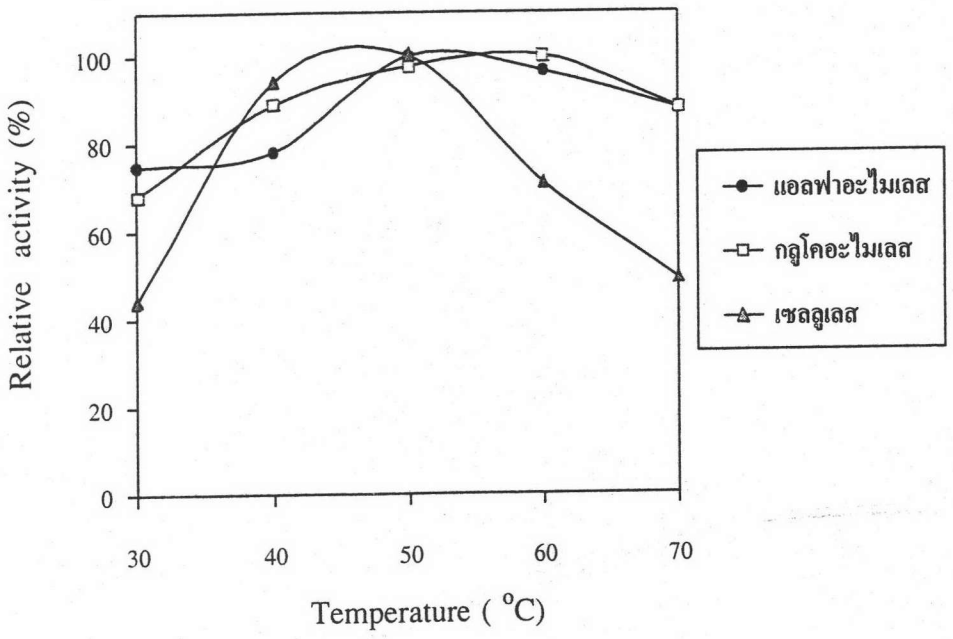
จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์และความคงทนของเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส พบว่าภาวะที่เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้น่าจะสามารถทำงานร่วมกันได้ คือ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ถึง 6.0 แต่ในการทดลองขั้นต่อไปเลือกที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นตัวที่ย่อยแป้งและให้น้ำตาลกลูโคส จึงเลือกใช้ภาวะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสทำงานได้ค่อนข้างดี และที่ภาวะนี้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเซลลูเลสยังพอทำงานได้ค่อนข้างดีเช่นกัน คิดเป็นร้อยละ 90.60, 56.79 และ 100 ตามลำดับ (รูปที่ 15)

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์

2.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 13,600 MWU ต่อกรัม และค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 (รูปที่ 17, ตารางที่ 6 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 1.583 ± 0.026 เป็น 2.026 ± 0.203 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 40 เป็น 50 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 60 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ก็แสดงแนวโน้มว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยนี้ คือ 50 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 6) การที่เอนไซม์นี้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงนี้มีผลทำให้ทั้งเอนไซม์และสับสเตรทที่เข้าทำปฏิกิริยากันมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น การชนกันต่อหน่วยเวลาเพิ่มขึ้นทำให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มขึ้น (Segel, 1976)

ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง คือ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าน้อยกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง คือ 65 - 75 องศาเซลเซียส (Solvey, 1993) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน และแอคติวิตีในการเร่งปฏิกิริยา จะเกิดเนื่องจากโครงสร้างระดับตติยภูมิ (tertiary structure) เรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จะต้องจับกับสับสเตรทที่บริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ระดับตติยภูมินี้มี



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์

ที่ภาวะ :

ปริมาณกากมันสำปะหลัง 60 มิลลิกรัม

อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 13,600 MWU ต่อกรัม

- ความเป็นกรดด่างในการย่อย 6.0

อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 10 DU ต่อกรัม

- ความเป็นกรดด่างในการย่อย 4.0

อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง 60 NCU ต่อกรัม

- ความเป็นกรดด่างในการย่อย 5.0

เวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ :

Relative activity 100 % ของเอนไซม์

- แอลฟาอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 2.026 ± 0.203 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลูโคอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 9.021 ± 0.383 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เซลลูเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.393 ± 0.022 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์

อุณหภูมิ (^{0}C)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ (mg/ml) โดยเอนไซม์		
	แอลฟาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	เซลลูเลส
30	1.518 ^{d} ± 0.084	6.146 ^{c} ± 0.118	0.173 ^{c} ± 0.025
40	1.583 ^{cd} ± 0.026	8.005 ^{b} ± 0.270	0.370 ^{a} ± 0.006
50	2.026 ^{a} ± 0.203	8.799 ^{a} ± 0.218	0.393 ^{a} ± 0.022
60	1.954 ^{ab} ± 0.007	9.021 ^{a} ± 0.383	0.279 ^{b} ± 0.015
70	1.778 ^{bc} ± 0.141	7.933 ^{b} ± 0.688	0.192 ^{c} ± 0.013

a,b,c... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในคอลัมม์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

พันธะไม่ใช่โควาเลนต์แรงอ่อนจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้โมเลกุลของเอนไซม์มีโครงสร้างละเอียดอ่อนมาก ถ้าโมเลกุลของสารปฏิกิริยามีพลังงานมากเกินไป โครงสร้างตติยภูมิจะเสียหาย (disrupt) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535) สับสเตรทที่ใช้คือกากมันสำปะหลัง ความบริสุทธิ์ไม่เท่ากับแป้ง มีสารอื่นปะปนมาก เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การชนกันระหว่างองค์ประกอบต่าง ๆ ของกากมันสำปะหลังจึงมีมากขึ้น จึงอาจทำให้โครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์เสียหายได้มากกว่าที่ภาวะเดียวกันเมื่อใช้แป้งเป็นสับสเตรท

2.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 10 DU ต่อกรัม และค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 (รูปที่ 17, ตารางที่ 6 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 6.146 ± 0.118 เป็น 8.799 ± 0.218

มิลิลกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 เป็น 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ทั้งเอนไซม์และสับสเตรทที่เข้าทำปฏิกิริยากันมีพลังงานจลน์เพิ่มขึ้น การชนกันต่อหน่วยเวลาเพิ่มขึ้น ทำให้ความเร็วของปฏิกิริยาการย่อยเพิ่มขึ้น (Segel, 1976) และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ก็แสดงแนวโน้มว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยนี้ คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 9.021 ± 0.383 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 60 เป็น 70 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้พลังงานจลน์สูงขึ้น แต่ก็ไปทำให้เอนไซม์เริ่มเสียสภาพธรรมชาติ จึงมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (Segel, 1976)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง คือ 60 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยแป้ง คือ 58 - 65 องศาเซลเซียส (Solvey, 1993)

2.3.3 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง 60 NCU ต่อกรัม และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 (รูปที่ 17, ตารางที่ 6 และภาคผนวก ค.) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นจาก 0.173 ± 0.025 เป็น 0.370 ± 0.006 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 เป็น 40 องศาเซลเซียส ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.3.1 และที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ก็แสดงแนวโน้มว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการย่อยนี้ คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.393 ± 0.022 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) และเมื่ออุณหภูมิในการย่อยเพิ่มขึ้นเป็น 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จะมีค่าลดลง ความสามารถในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นหรือลดลงมีเหตุผลดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.3.1 และ 2.3.2

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง คือ 50 องศาเซลเซียส มีค่าน้อยกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อย carboxy methyl cellulose คือ 65 องศาเซลเซียส (Novo Nordisk, 1993)

ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ถ้าจะนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส, กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส มาทำงานร่วมกัน คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.4 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

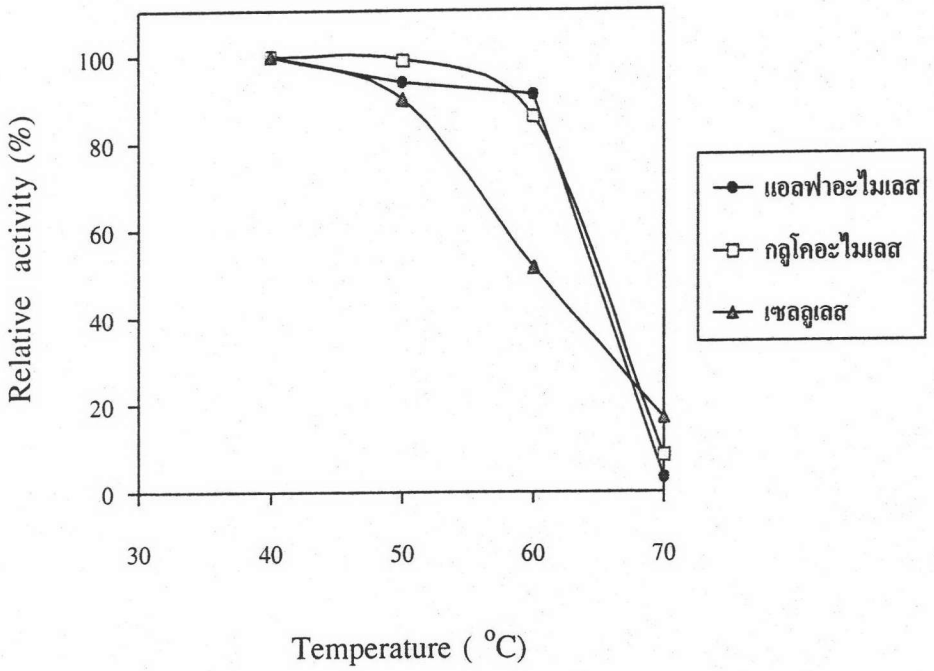
2.4.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยที่ความเป็นกรดด่าง 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 13,600 MWU ต่อกรัม (รูปที่ 18, ตารางที่ 7 และภาคผนวก ค.) แสดงแนวโน้มว่าการบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อนำมาย่อยกากมันสำปะหลังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 60 เป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ลดลงจาก 1.416 ± 0.087 เป็น 0.050 ± 0.029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 7) การที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีโครงสร้างที่ละเอียดอ่อนมาก ถ้าโมเลกุลมีพลังงานมากเกินไปโครงสร้างตติยภูมิจะเสียหาย มีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ และสูญเสียแอคติวิตีไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มีความคงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส

2.4.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมัน



รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ที่ภาวะ :

ปริมาณกากมันสำปะหลัง	60	มิลลิกรัม
อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	13,600	MWU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	6.0	
อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง	10	DU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	4.0	
อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง	60	NCU ต่อกรัม
- ความเป็นกรดด่างในการย่อย	5.0	
อุณหภูมิในการวัดแอคติวิตี	30	องศาเซลเซียส
เวลาในการย่อย	1	ชั่วโมง

หมายเหตุ :

Relative activity 100 % ของเอนไซม์

- แอลฟาอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 1.551 ± 0.159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- กลูโคอะไมเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 6.799 ± 0.269 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- เซลลูเลส ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.214 ± 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

อุณหภูมิ (^{0}C)	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ที่ผลิตได้ (mg/ml) โดยเอนไซม์		
	แอลฟาอะไมเลส	กลูโคอะไมเลส	เซลลูเลส
40	1.551 ^{a} ± 0.159	6.799 ^{a} ± 0.269	0.214 ^{a} ± 0.025
50	1.461 ^{a} ± 0.049	6.757 ^{a} ± 0.230	0.193 ^{a} ± 0.003
60	1.416 ^{a} ± 0.087	5.866 ^{b} ± 0.120	0.111 ^{b} ± 0.003
70	0.050 ^{b} ± 0.029	0.565 ^{c} ± 0.085	0.036 ^{c} ± 0.014

a,b,c... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันในคอลัมม์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

โดยใช้อัตราส่วนของกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 10 DU ต่อกรัม (รูปที่ 18, ตารางที่ 7 และภาคผนวก ค.) แสดงแนวโน้มว่าการบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อนำมาย่อยกากมันสำปะหลังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จะลดลง (ตารางที่ 7)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มีความคงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส

2.4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังปริมาณ 60 มิลลิกรัม ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผ่านการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการย่อยที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเซลลูเลสต่อกากมันสำปะหลัง 60 NCU ต่อกรัม (รูปที่ 18, ตารางที่ 7 และภาคผนวก ค.) แสดงแนวโน้มว่าการบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อนำมาย่อยกากมันสำปะหลังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่

ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้จะลดลง (ตารางที่ 7)

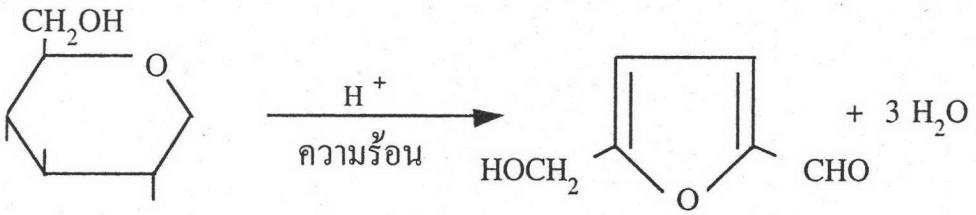
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลส มีความคงทนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของเอนไซม์, ความคงทนของเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่างต่าง ๆ , ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ และความคงทนของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส พบว่า ภาวะที่เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด น่าจะทำงานร่วมกันได้ คือ ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. ศึกษากระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง

3.1 การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรด (AOAC, 1990)

เมื่อนำกากมันสำปะหลังมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ทำการรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson พบว่า ร้อยละของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ คือ 61.86 ± 0.62 จากการทดลองนี้พบว่า การย่อยด้วยกรดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่สูงเท่าที่ควร ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของกลูโคสอาจเกิดการแตกตัวกลายเป็น levulinic และ formic acid และในภาวะที่เป็นกรดและมีความร้อนช่วยส่งเสริม (Dziedzic and Kearsley, 1984) น้ำตาลจะสลายน้ำออกแล้วเกิดไซโคลเซชันดังสมการ



กลูโคส 5-ไฮดรอกซีเมทธิล เฟอฟูรัล

รูปที่ 19 ปฏิกิริยาไซโคลเซชัน

ที่มา : Dziedzic and Kearsley (1984)

3.2 การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ผสม

3.2.1 อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลัง

เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 2 กรัมต่อเดซิลิตร เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 5.0 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสอัตราส่วนต่าง ๆ ปริมาตรรวมของเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 8160 MWU ต่อมิลลิลิตร และ 6 DU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยาเท่ากับ 50 มิลลิลิตร (ตารางที่ 8 และรูปที่ 20) พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลส 1.0 : 0 จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อยที่สุด เนื่องจากใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงขนาดเดียว ผลผลิตที่ได้จึงเป็นพวก glucan และ limit dextrin มีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียว โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลส 0 : 1.0 พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มากกว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในการย่อยเพียงชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ คือ พันธะไกลโคซิล α - 1,4, α - 1,6 และ α - 1,3 การตัดสายโพลิเมอร์จะตัดด้าน non - reducing เข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จะเป็นกลูโคส แต่เมื่อใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสในการย่อย พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว และที่อัตราส่วนเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลส 0.5 : 0.5 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด สูงกว่าที่อัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยผลิตได้ 9.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่อัตราส่วนนี้ใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพียงชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร จากผลในตารางที่ 8 ถ้านำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ เมื่อใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเพียงชนิดเดียว 1.0 มิลลิลิตร รวมกับเมื่อใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียว 1.0 มิลลิลิตร จะผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ เท่ากับ 9.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร่วมกับกลูโคอะไมเลส อัตราส่วน 0.5 : 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถผลิตได้ 9.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 0.494 กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ต่อกรัมกากมันสำปะหลัง แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส จะช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น เนื่องจาก

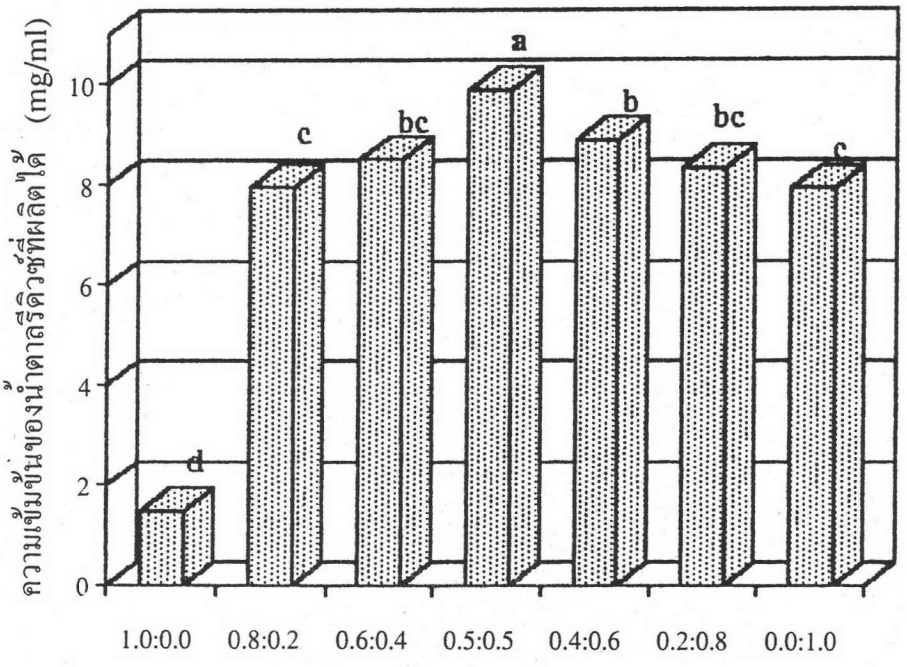
เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยโมเลกุลของแป้งอย่างสุ่ม ทำให้มีปลาย non - reducing มากขึ้น เอนไซม์กลูโคอะไมเลสจึงเข้าตัดพันธะที่ปลาย non - reducing ได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Fujii, Homma และ Taniguchi (1987) ซึ่งได้ทดลองใช้เอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้งมันฝรั่ง ความเข้มข้น 2 กรัมต่อเดซิลิตร โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 51, 102 และ 204 U และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 2 U พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียวรวมกันมากกว่า 2 เท่า

เมื่อได้อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลสที่เหมาะสม คือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 8160 MWU ต่อเดซิลิตร ต่อกลูโคอะไมเลส 6 DUต่อเดซิลิตร จึงทำการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมต่อกากมันสำปะหลัง

ตารางที่ 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อย่อยสารละลายกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 2 g/dl ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส อัตราส่วนต่าง ๆ กัน ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 50 °C

อัตราส่วนของเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส : กลูโคอะไมเลส	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ ผลิตได้ (mg/ml)
1.0 : 0	$1.48^{d} \pm 0.10$
0.8 : 0.2	$7.94^{c} \pm 0.18$
0.6 : 0.4	$8.48^{bc} \pm 0.56$
0.5 : 0.5	$9.88^{a} \pm 0.04$
0.4 : 0.6	$8.86^{b} \pm 0.30$
0.2 : 0.8	$8.32^{bc} \pm 0.24$
0: 1.0	$7.90^{c} \pm 0.04$

a,b,c... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



<u>รูปที่ 20</u> ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้กับอัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อกลูโคอะไมเลสที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ที่ภาวะ :

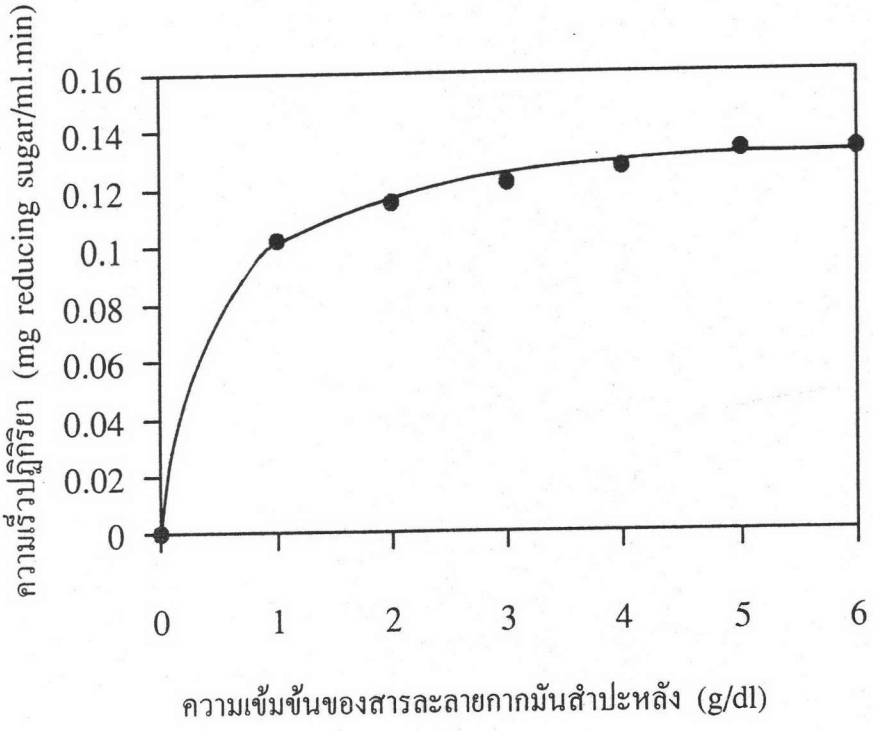
ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง	2 กรัมต่อเดซิลิตร
เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส	1 มิลลิลิตร
- แอลฟาอะไมเลส 8160 MWU ต่อมิลลิลิตร	
- กลูโคอะไมเลส 6 DU ต่อมิลลิลิตร	
ความเป็นกรดด่าง	5.0
อุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส
เวลาในการย่อย	1 ชั่วโมง

3.2.2 อัตราส่วนของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง

เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 1 ถึง 6 กรัมต่อเดซิลิตร เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 5.0 ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 1428 MWU ต่อเดซิลิตร ผสมกลูโคอะไมเลสความเข้มข้น 1.05 DU ต่อเดซิลิตร ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยาเท่ากับ 50 มิลลิลิตร (ตารางที่ 9 และรูปที่ 21) พบว่าเมื่อกำหนดให้ปริมาณเอนไซม์คงที่ แล้วแปรค่าความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง ดังรูปที่ 21 เรียก Substrate Saturation cure ซึ่งมีลักษณะเป็นrectangular hyperbola กล่าวคือ เมื่อปริมาณกากมันสำปะหลังต่ำจะได้ first order kinetics คือความเร็วของปฏิกิริยาขึ้นกับความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าลง ซึ่งในการทดลองนี้ค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (Vmax) มีค่าเท่ากับ 0.133 mg reducing sugar/ml.min

ตารางที่ 9 ความเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นกากมันสำปะหลังต่าง ๆ

ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง (g/dl)	ความเร็วของปฏิกิริยา (mg reducing sugar/ml.min)
1	$0.102^{d} \pm 0.009$
2	$0.115^{c} \pm 0.006$
3	$0.122^{bc} \pm 0.004$
4	$0.127^{ab} \pm 0.002$
5	$0.133^{a} \pm 0.001$
6	$0.133^{a} \pm 0.001$



รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วปฏิกิริยากับความเข้มข้นร้อยละของสารละลายกากมันสำปะหลัง

ที่ภาวะ :

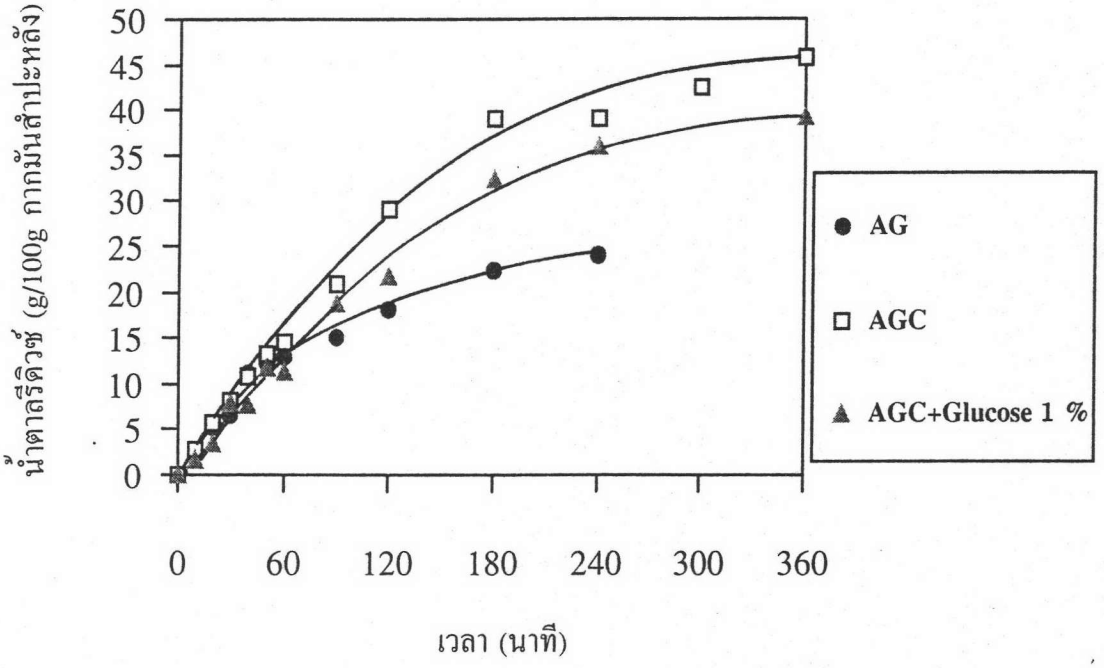
ความเข้มข้นของเอนไซม์		
- แอลฟาอะไมเลส	1428	MWU ต่อเดซิลิตร
- กลูโคอะไมเลส	1.05	DU ต่อเดซิลิตร
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	
อุณหภูมิ	50	องศาเซลเซียส
เวลาในการย่อย	15	นาที

3.2.3 การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส

เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อเดซิลิตร ด้วยแอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 285.6 MWU ต่อกรัม และกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 0.21 DU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยา 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22 พบว่าในช่วง 50 นาทีแรก ปริมาณน้ำตาลที่ผลิตได้ผลิตได้ด้วยความเร็วที่คงที่ คือผลิตได้ 0.135 mg reducing sugar / ml . min แต่หลังจากเวลา 50 นาที ความเร็วในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลง ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง หรืออาจเนื่องมาจากผลผลิตที่ได้คือน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าแป้งมาก ทำให้สามารถสอดแทรกและกระจายไปทั่วสารละลาย จึงไปขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท หรืออาจเป็นเพราะกลูโคสที่ผลิตได้ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

3.2.4 การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อเดซิลิตร ด้วยแอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 285.6 MWU ต่อกรัม กลูโคอะไมเลส 0.21 DU ต่อกรัม และเซลลูเลส 15.48 NCU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยา 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22 พบว่าการใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสสามารถย่อยกากมันสำปะหลังได้ด้วยความเร็วที่ค่อนข้างคงที่เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือสามารถผลิตได้ด้วยความเร็วซึ่งมากกว่าการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสเล็กน้อย การใช้เอนไซม์ 2 ชนิด สามารถย่อยกากมันสำปะหลังด้วยความเร็วที่ค่อนข้างคงที่เป็นเวลา 50 นาที หลังจากนั้นความเร็วในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลง ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ แต่เมื่อมีการเพิ่มเอนไซม์เซลลูเลสลงไปจะสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ด้วยความเร็วคงที่เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีปริมาณมากกว่าการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส การที่



รูปที่ 22 ผลของการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์

A = เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

G = เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

C = เอนไซม์เซลลูเลส

ที่ภาวะ :

ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง	5	กรัมต่อเดซิลิตร
ความเข้มข้นของเอนไซม์		
- แอลฟาอะไมเลส	285.6	MWU ต่อกรัมกากมัน
- กลูโคอะไมเลส	0.21	DU ต่อกรัมกากมัน
- เซลลูเลส	15.48	NCU ต่อกรัมกากมัน
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	
อุณหภูมิ	50	องศาเซลเซียส

เอนไซม์เซลลูเลสช่วยให้สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยความเร็วคงที่เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสช่วยทำให้แป้งถูกปลดปล่อยออกจากการเกาะกุมของลิกโนเซลลูโลส ทำให้มีแป้งอยู่ในรูปอิสระมากขึ้น จึงสามารถจับกับเอนไซม์อะไมเลสได้สะดวกขึ้น ซึ่ง Menezes และคณะ (1978) ได้ทำการทดลองเติมเอนไซม์เซลลูเลสในการแซคคาริฟิเคชันมันสำปะหลัง พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมเอนไซม์เซลลูเลสจะช่วยลดความหนืดลง จึงทำให้เอนไซม์อะไมเลสจับกับแป้งได้เร็วขึ้น จากผลการทดลองพบว่าหลังจากทำการย่อยเป็นเวลา 180 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เริ่มคงที่ ความเร็วในการผลิตเริ่มลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้ว คือ ความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง น้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าแป้งมาก จึงกระจายอยู่ทั่วไปในสารละลาย ทำให้ไปขัดขวางการจับกันระหว่างเอนไซม์อะไมเลสและแป้ง หรือกลูโคสอาจเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

3.2.5 ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 1 กรัมลงในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อเดซิลิตร ทำการย่อยด้วยแอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 285.6 MWU ต่อกรัม กลูโคอะไมเลส 0.21 DU ต่อกรัม และเซลลูเลส 15.48 NCU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยา 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22 พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงในสารละลายกากมันสำปะหลังมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ลดลง แสดงว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ผสมนี้ ซึ่งณรงค์ อัศวสุนทรางกูร (2534) ได้ทำการทดลองศึกษาการย่อยสลายเดกซตรินด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในระบบ Continuous Stirred Tank Membrane Reactor พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสโดยเป็นตัวยับยั้งแบบ Competitive นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสยังเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535) ดังนั้นการแยกน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการย่อยเพื่อลดความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระบบโดยใช้อัลทราฟิลเทรชัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งให้เอนไซม์ผสมนี้สามารถย่อยกากมันสำปะหลังได้ดีขึ้น ซึ่งจะทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสมากขึ้นด้วย

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแผ่นกรอง

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์และสารละลายน้ำตาลกลูโคสกรองผ่านเครื่องอัลทราฟิลเทรชันที่ความดันเฉลี่ย 98 kPa แผ่นกรองที่ใช้ผลิตจาก polyethersulfone มีขนาด Mw. Cut of 10 K ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ค.)

ตารางที่ 10 ค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันของแผ่นกรองในการกักโปรตีนและน้ำตาลกลูโคส

ตัวถูกละลาย	ความเข้มข้นของสารละลายก่อนผ่านการกรอง (mg/ml)	ความเข้มข้นในเพอมิเอท (mg/ml)	ค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันปรากฏ
โปรตีน	361.957 ± 44.011	27.808 ± 6.553	0.924 ± 0.009
น้ำตาลกลูโคส	1.043 ± 0.39	0.949 ± 0.034	0.090 ± 0.003

จากการทดลองพบว่าแผ่นกรองมีค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันปรากฏในการกักโปรตีนและน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 0.924 ± 0.009 และ 0.090 ± 0.003 ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันหมายถึงความสามารถในการกักตัวถูกละลายหนึ่ง ๆ ของแผ่นกรอง แสดงว่าแผ่นกรองนี้สามารถกักเอนไซม์และน้ำตาลกลูโคสไว้ได้ร้อยละ 92.4 และ 9.0 ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากเชื้อ Bacillus subtilis และกลูโคอะไมเลสจากเชื้อ Aspergillus niger มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 93,000 และ 63,000 ตามลำดับ (Fogarty and Kelly, 1990) ส่วนเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ผสมประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์ประกอบขนาดโมเลกุลเล็กที่สุดในเซลลูเลสจากเชื้อ Trichoderma reesei มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12,500 (Ohlson, Tragardh and Hahn-Hagerdal, 1984) ในที่นี้เอนไซม์เป็นโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลมากจึงถูกแผ่นกรองกักไว้ ส่วนน้ำตาลกลูโคสมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Mw.180) จึงลอดผ่านแผ่นกรองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ohlson, Tragardh และ Hahn-Hagerdal ในปี

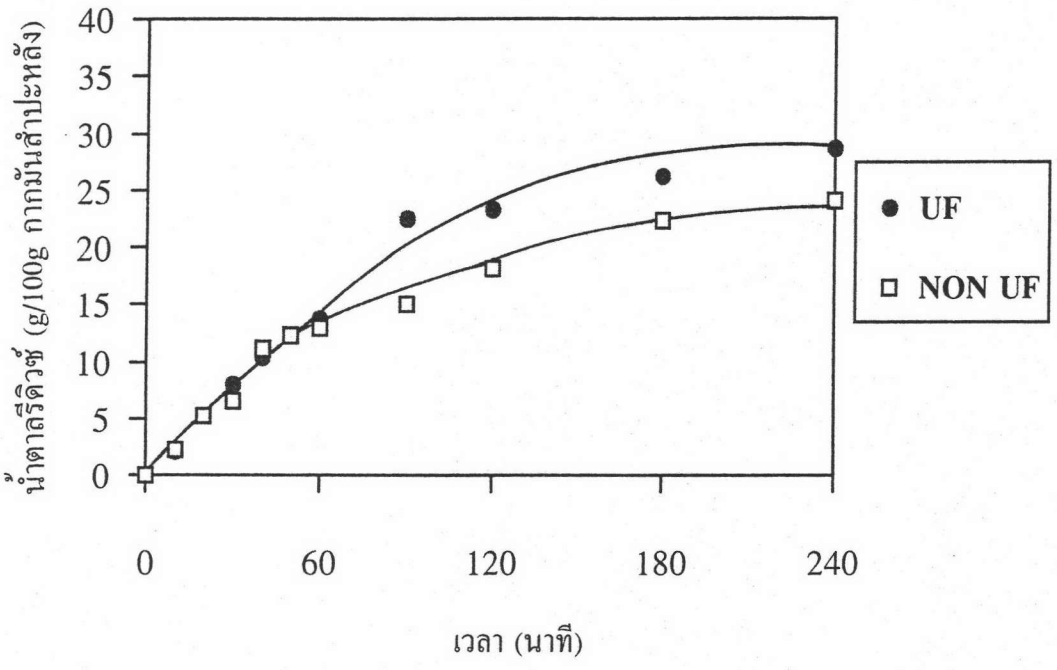
ค.ศ. 1984 ได้ทำการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันของแผ่นกรองในการกักเอนไซม์เซลลูเลส และพบว่าการใช้แผ่นกรองชนิด Polyethersulfone ขนาด 10K และแผ่นกรองชนิด Polyamide ขนาด 0.8 K สามารถกักเอนไซม์ไว้ได้ทั้งหมด มีค่าสัมประสิทธิ์รีเจคชันเท่ากับ 1 ดังนั้นแผ่นกรองชนิด Polyethersulfone ขนาด 10 K นี้จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. การทดลองใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.3 - 3.2.5 พบว่าหลังจากทำการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ผสมเป็นระยะเวลาหนึ่ง ความเร็วในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้มีผลไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในระบบ จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงทำการทดลองประยุกต์ใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง เพื่อแยกน้ำตาลกลูโคสที่ผลิตได้ออกจากระบบ ซึ่งคาดว่าจะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น

5.1 การทดลองใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 23 เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อเดซิลิตร ด้วยแอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 285.6 MWU ต่อกรัม และกลูโคอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 0.21 DU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยาเท่ากับ 3,000 มิลลิลิตร หลังจากทำการย่อยเป็นเวลา 50 นาที นำสารละลายปฏิกิริยาผ่านเครื่องอัลทราฟิลเทรชัน เนื่องจากหลังจากเวลา 50 นาที ความเร็วปฏิกิริยาเริ่มลดลง โดยควบคุมความดันเฉลี่ยในเครื่องกรองให้คงที่ที่ 98 kPa ควบคุมอัตราการไหลผ่านผิวหน้าแผ่นกรองให้คงที่ที่ 130 มิลลิลิตรต่อวินาที และควบคุมอุณหภูมิในถังหมักให้ ได้ 50 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำหล่อเย็น เติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 M ความเป็นกรดด่าง 5.0 ลงในถังหมักด้วยอัตราเร็วเท่ากับปริมาตรส่วนที่กรองได้เพื่อควบคุมปริมาตรสารละลายปฏิกิริยาให้คงที่ พบว่าหลังจากเวลา 50 นาที เมื่อมีการกรอง ปริมาณ



รูปที่ 23 ผลการทดลองใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส

UF = อัลทราฟิลเทรชัน

ที่ภาวะ :

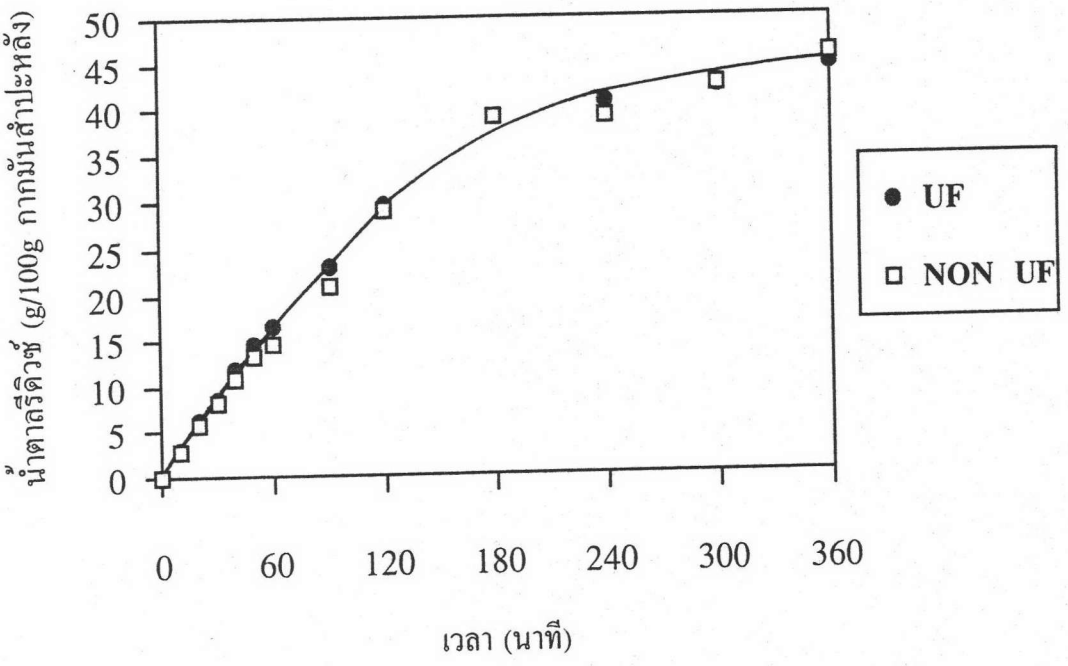
ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง	5	กรัมต่อเดซิลิตร
ความเข้มข้นของเอนไซม์		
- แอลฟาอะไมเลส	285.6	MWU ต่อกรัมกากมัน
- กลูโคอะไมเลส	0.21	DU ต่อกรัมกากมัน
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	
อุณหภูมิ	50	องศาเซลเซียส
กรองผ่านเครื่องอัลทราฟิลเทรชันหลังจากย่อย	50	นาที

(ความดันเฉลี่ย 98 kPa, อัตราการไหลผ่านผิวหน้าแผ่นกรอง 130 ml / sec)

น้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น โดยเปรียบเทียบกันการย่อยโดยไม่มีการกรอง แต่หลังจากเวลา 90 นาที เมื่อมีการกรอง พบว่า ความเร็วปฏิกิริยาเริ่มลดลงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การแยกเอาผลิตภัณฑ์ซึ่งในที่นี้คือน้ำตาลกลูโคสออกจากระบบมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่เริ่มลดลงดีขึ้น เนื่องจากเป็นการลดตัวรบกวนในระบบ แต่หลังจากเวลา 90 นาที การทำงานของเอนไซม์เริ่มลดลง สาเหตุเนื่องจากพื้นที่ในการกรองมีจำกัด จึงดึงน้ำตาลกลูโคสออกจากระบบได้น้อยกว่าที่ระบบสร้างขึ้น ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นจนถึงจุดไปรบกวนการทำงานของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าจะทำให้การทำงานของระบบดีขึ้นจึงควรพัฒนาเครื่องมือให้มีพื้นที่ในการกรองมากขึ้น ปรับความดันได้สูงขึ้น เพื่อแยกผลิตภัณฑ์ออกจากระบบได้มากขึ้น

5.2 การทดลองใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

เมื่อทำการย่อยสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 5 กรัมต่อเดซิลิตร ด้วยแอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส แสดงดังรูปที่ 24 โดยใช้อัตราส่วนของแอลฟาอะไมเลสต่อกากมันสำปะหลัง 285.6 MWU ต่อกรัม กลูโคอะไมเลส 0.21 DU ต่อกรัม และเซลลูเลส 15.48 NCU ต่อกรัม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตรสุทธิของสารละลายปฏิกิริยาเท่ากับ 3,000 มิลลิลิตร หลังจากทำการย่อยเป็นเวลา 180 นาที นำสารละลายปฏิกิริยาผ่านเครื่องอัลทราฟิลเทรชัน เนื่องจากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด หลังจากเวลา 180 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เริ่มลดลง โดยควบคุมความดันเฉลี่ยในเครื่องกรองให้คงที่ที่ 98 kPa ควบคุมอัตราการไหลผ่านผิวหน้าแผ่นกรองให้คงที่ที่ 130 มิลลิลิตรต่อวินาที และควบคุมอุณหภูมิในถังหมักให้ได้ 50 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำหล่อเย็น เติมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.05 M ความเป็นกรดด่าง 5.0 เพื่อรักษาปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อใช้เอนไซม์ 3 ชนิดในการย่อย ชุดที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องอัลทราฟิลเทรชันและชุดที่ไม่ผ่านการกรองให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเครื่องอัลทราฟิลเทรชันมีพื้นที่ในการกรองจำกัด จึงแยกน้ำตาลกลูโคสออกจากระบบได้น้อยกว่าที่ระบบสร้างขึ้น



รูปที่ 24 ผลการทดลองใช้อัลทราฟิลเทรชันในกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

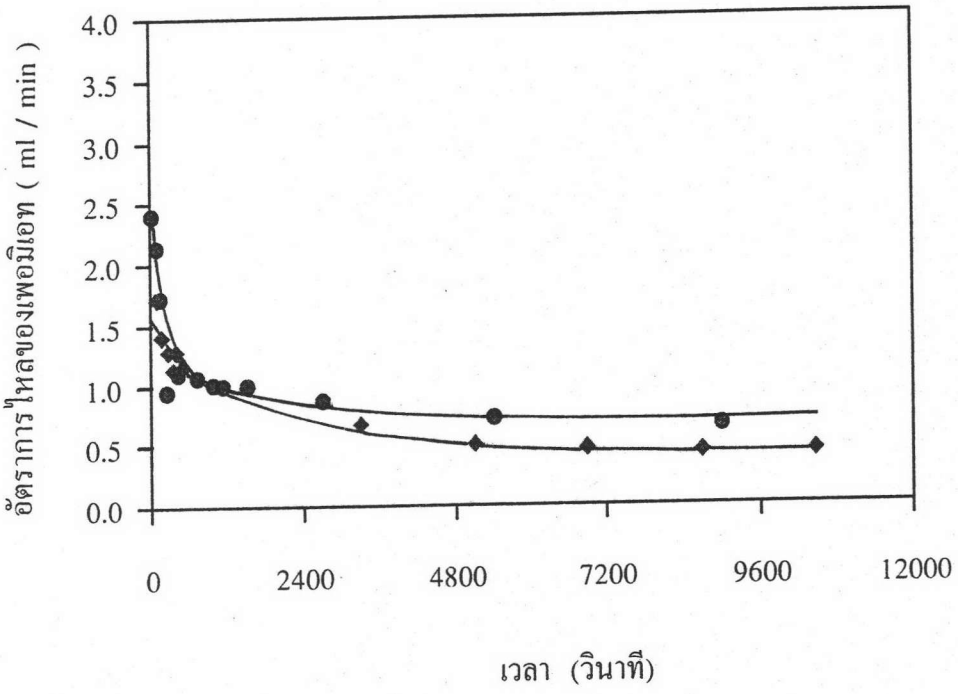
UF = อัลทราฟิลเทรชัน

ที่ภาวะ :

ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง	5	กรัมต่อเดซิลิตร
ความเข้มข้นของเอนไซม์		
- แอลฟาอะไมเลส	285.6	MWU ต่อกรัมกากมัน
- กลูโคอะไมเลส	0.21	DU ต่อกรัมกากมัน
- เซลลูเลส	15.48	NCU ต่อกรัมกากมัน
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	
อุณหภูมิ	50	องศาเซลเซียส
กรองผ่านเครื่องอัลทราฟิลเทรชันหลังจากย่อย	180	นาที

(ความดันเฉลี่ย 98 kPa, อัตราการไหลผ่านผิวหน้าแผ่นกรอง 130 ml / sec)

5.3 ศึกษาอัตราการไหลของเพอมิเอท



รูปที่ 25 อัตราการไหลของเพอมิเอท เมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์

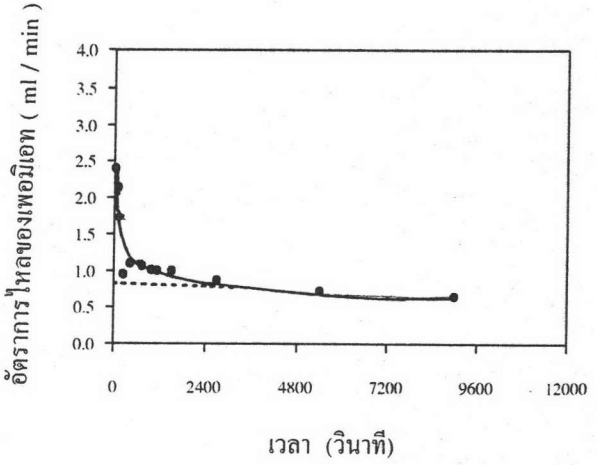
◆ = แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส

● = แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

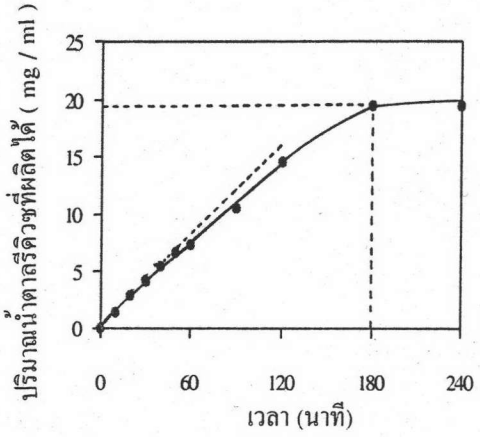
การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเพอมิเอทที่ความดันคงที่ที่ 98 kPa อัตราการไหลผ่านผิวหน้าแผ่นกรองคงที่ที่ 130 มิลลิลิตรต่อวินาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25 พบว่าอัตราการไหลของเพอมิเอทของสารละลายกากมันสำปะหลังที่ทำการย่อยทั้งสองวิธี คือใช้เอนไซม์ 2 และ 3 ชนิด จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรก เนื่องจากชั้นเจลถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วหน้าผิวแผ่นกรอง หลังจากนั้นอัตราการไหลของเพอมิเอทจะลดลงอย่างช้า ๆ จนเข้าสู่ภาวะสมดุล ทำให้อัตราการไหลของเพอมิเอทค่อนข้างคงที่ เนื่องจากชั้นเจลถูกพัดพาออกจากผิวหน้าแผ่นกรองโดยแรงเฉือนที่เกิดจากการพัดพาไปด้วยอัตราเร็วที่เท่ากับอัตราในการสร้างชั้นเจล ในกระบวนการอัลทราฟิลเทรชันการกรองแบบ Cross flow นี้จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการกรองแบบ Dead-end เพราะจะลดปัญหาการอุดตันของแผ่นกรองลงได้ (Shirato และคณะ, 1994) ทำให้เมื่อเข้าสู่ภาวะสมดุล อัตราการไหลของเพอมิเอทจะไหลด้วยอัตราค่อนข้างคงที่

5.4 การคำนวณหาพื้นที่ที่เหมาะสมในการกรอง

จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสในการย่อยกากมันสำปะหลัง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลส ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดในการคำนวณหาพื้นที่ที่เหมาะสมในการกรอง เพื่อที่จะดึงน้ำตาลออกให้เท่ากับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบต่อไป



รูปที่ 26 อัตราการไหลของเพอมิเอท ที่ความดัน 98 kPa เมื่อทำการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส



รูปที่ 27 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้เมื่อย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสผสมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

ระบบขนาด 3,000 มิลลิลิตร มีพื้นที่ในการกรอง 28.27 ตารางเซนติเมตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ค.) จากการทดลองเมื่ออัตราการไหลของเพอมิเอทเข้าสู่ภาวะคงที่มีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที (รูปที่ 26) จะได้อัตราการดึงน้ำตาลรีดิวซ์ออกจากระบบเท่ากับผลคูณของอัตราการไหลของเพอมิเอทกับความเข้มข้นของน้ำตาลในระบบที่เวลานั้น ซึ่งจากการทดลองระบบดึงน้ำตาลออกได้ 15.62 มิลลิกรัมต่อนาที หรือดึงน้ำตาลออกได้ 0.55 มิลลิกรัมต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร จากรูป 27 ระบบผลิตน้ำตาลได้ 423 มิลลิกรัมต่อนาที ดังนั้นขนาดของพื้นที่การกรองที่ทำให้สามารถดึงน้ำตาลออกจากระบบสมดุลกับอัตราการผลิต น้ำตาลรีดิวซ์ คือ 769 ตารางเซนติเมตร หมายความว่าต้องการพื้นที่ในการกรอง 0.256 ตารางเซนติเมตรต่อปริมาตรสารละลายกากมันสำปะหลัง 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือต้องการ พื้นที่ในการกรองมากกว่าพื้นที่ที่ใช้ในการทดลองนี้ประมาณ 27 เท่า