บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วิธีดำเนินการทดลอง

2.1.1 กากมันสำปะหลัง

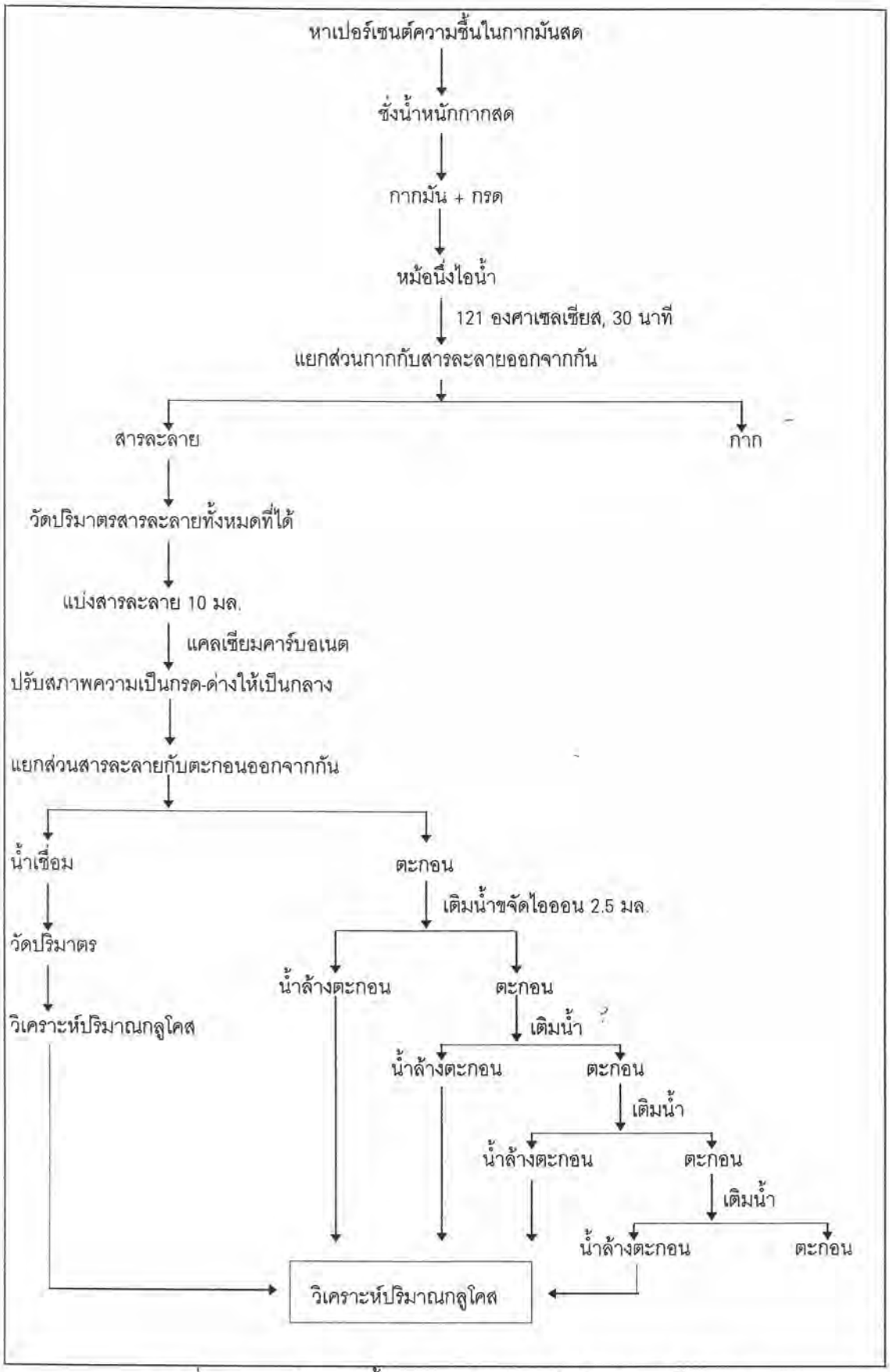
ควบคุมปริมาณกากมันสำปะหลังสดที่นำมาใช้ในทุกการทดลองเท่ากับ 5 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข.)

2.1.2 วิธีการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด

2.1.2.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นและปริมาตรกรดต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้ปริมาณเท่ากับกากมันแห้ง 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมกรดที่แปรชนิด ความเข้มข้น และปริมาตร ตามแผนการทดลองที่กำหนด ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอะลูมินั่มฟรอยก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วแยกส่วนกากมันและสารละลายออกจากกันด้วยถุงกรองซึ่งใส่ไว้ในกระบอกปั่น (centrifuge tube) ของเครื่องปั่นแยก (ดังรูปที่ 2-1) ใช้ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมด จากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้จากการย่อย 10 มล. มาปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต แยกส่วนตะกอนออกโดยเอาเฉพาะส่วนสารละลายที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาวัดปริมาตร ส่วนตะกอนที่เหลือนำมาล้างด้วยน้ำขจัดไอออนครั้งละ 2.5 มล. ปั่นแยกส่วนสารละลายและตะกอนออกจากกันด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาตรของน้ำล้างตะกอนดังกล่าว นำส่วนตะกอนมาล้างซ้ำเช่นเดิมกระทั่งน้ำล้างตะกอนใสไม่มีสี (คาดว่าความเข้มข้นน้ำตาลน้อยมาก) นำสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันและน้ำล้างตะกอนแต่ละครั้งไปทำการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสด้วย พี.จี.โอ. เอนไซม์ แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 2-2

รูปที่ 2-1 ลักษณะของกระบอกปั่น (centrifuge tube) ที่มีการดัดแปลงโดยใส่ถุงกรองไว้ข้างในเพื่อใช้ในการปั่นแยกส่วนกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยกับส่วนของสารละลายที่ได้ออกจากกัน



รูปที่ 2-2 แผนผังแสดงขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด

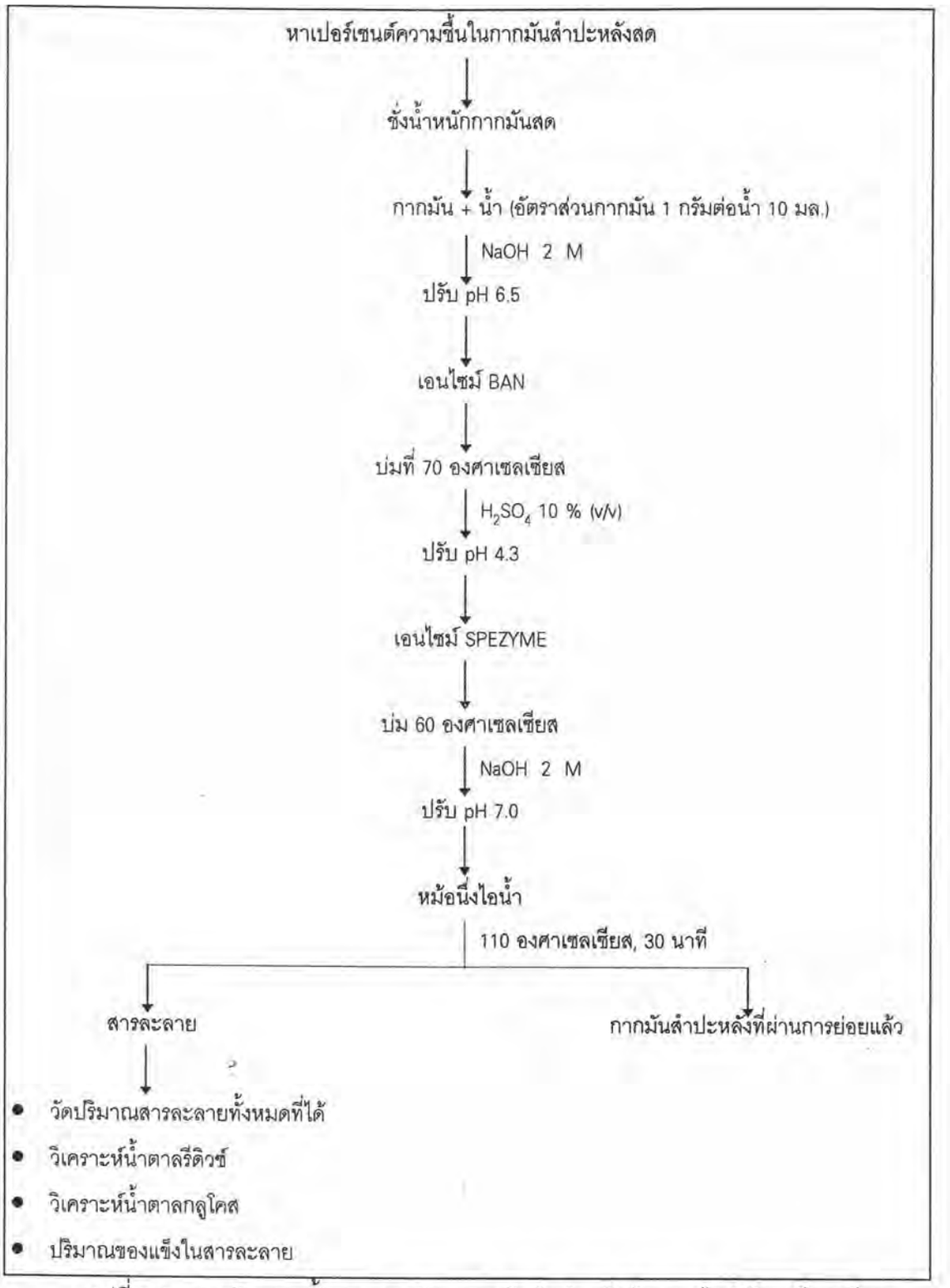
2.1.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้ปริมาณเท่ากับกากมันแห้ง 5 กรัม ใส่ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมกรดที่แปรชนิด ความเข้มข้น และปริมาตรตามแผนการทดลองที่กำหนด ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอะลูมินั่มฟรอย์ ก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งไอน้ำที่ระดับอุณหภูมิและระยะเวลาตามที่กำหนดไว้ในแผนการทดลอง ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วแยกส่วนกากมันและสารละลายออกจากกันด้วยถุงกรองซึ่งใส่ไว้ในกระบอกปั่นของเครื่องปั่นแยกใช้ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมด จากนั้นแบ่งสารละลายที่ได้จากการย่อย 10 มล. มาปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนจึงค่อยแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาวัดปริมาตร ส่วนตะกอนที่เหลือนำมาล้างด้วยน้ำขจัดไอออนครั้งละ 2.5 มล. ปั่นแยกส่วนสารละลายและตะกอนออกจากกันด้วยความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนซ้ำเช่นเดิมจนครบจำนวนครั้งที่กำหนด นำน้ำล้างตะกอนแต่ละครั้งมารวมกันแล้ววัดปริมาตรทั้งหมด นำสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันและน้ำล้างตะกอนไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วย พี.จี.โอ. เอนไซม์

2.1.3 วิธีการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

2.1.3.1 การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้เกิดลิเคอแฟคชั่น โดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN)

ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้ปริมาณเท่ากับกากมันแห้ง 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมน้ำขจัดไอออนขวดละ 50 มล. ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 - 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เติมเอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทันทีด้วยกรดซัลฟิวริก 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ให้มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 4.3 จะได้กากมันสำปะหลังที่ผ่านขั้นตอนการเกิดลิเคอแฟคชั่น ที่ต่อไปจะเรียกว่า liquified cassava pulp หรือ LCP ซึ่งพร้อมจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) เพื่อให้เกิด แซคคาริฟิเคชั่นต่อไปได้ แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 2-3



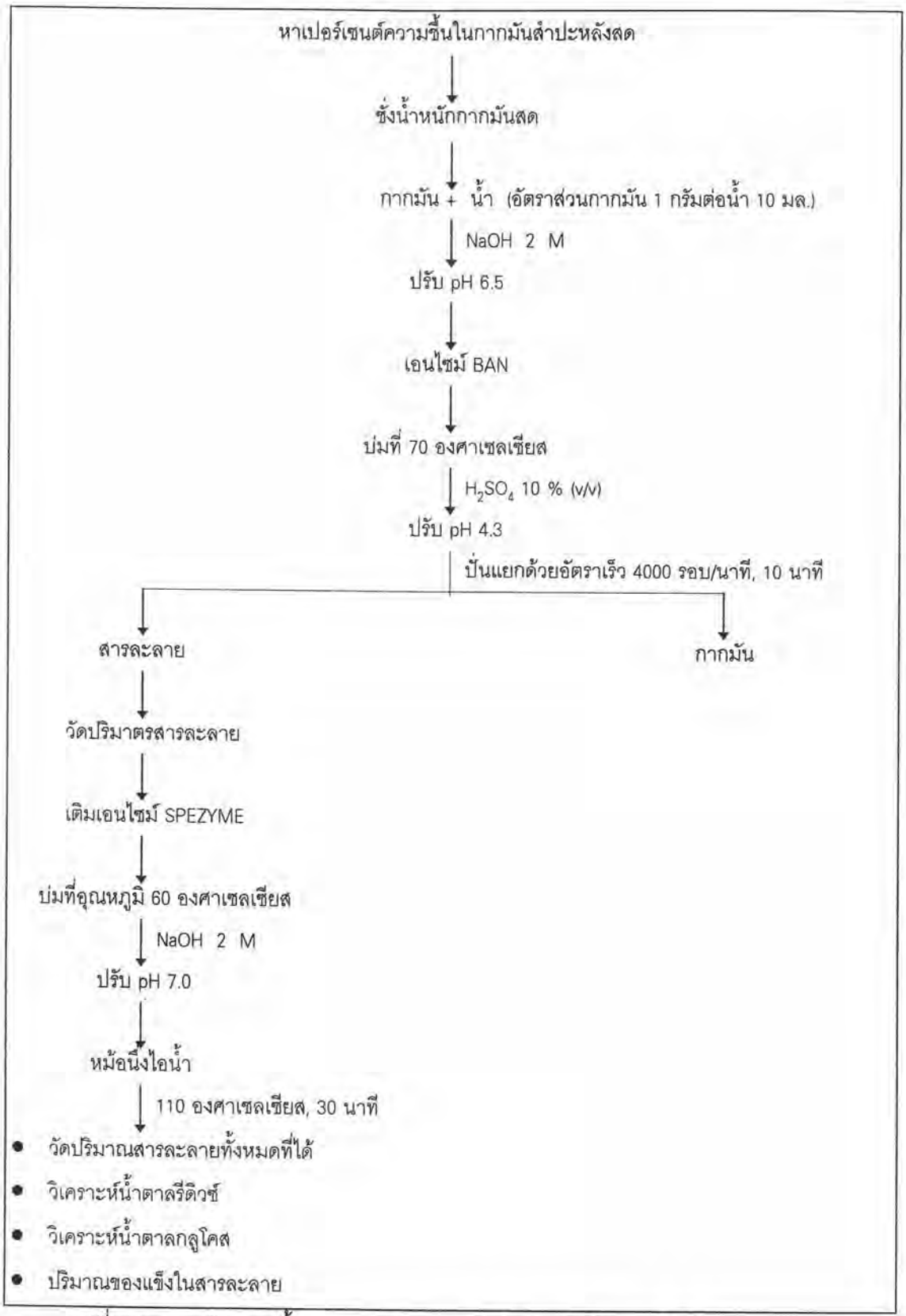
รูปที่ 2-3 แผนผังแสดงขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยเทียบเคียงจากสภาวะการย่อยแป้งในโรงงานอุตสาหกรรม

2.1.3.2 การปรับปรุงวิธีการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้เกิดลิเคอแฟคชั่น โดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN)

ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้ปริมาณเท่ากับกากมันแห้ง 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมน้ำที่เตรียมจากการผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ลงไปในน้ำในอัตราส่วน 5 มล.ต่อน้ำ 1 ลิตร แทนการใช้น้ำขจัดไอออนบริสุทธิ์ ปริมาตร 50 มล. ลงในกากมันและผสมให้เข้ากัน เติม เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 4.3 ด้วยสารละลายซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

2.1.3.3 การสกัดแยกส่วนสารละลายจากการเกิดลิเคอแฟคชั่นของกากมันสำปะหลังกับเส้นใยกากมันออกจากกัน

ใช้อัตราส่วนกากมันสำปะหลัง 1 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำที่เติม 10 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5-7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เติมเอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) (อัตราส่วนเอนไซม์ 500 หน่วย : กากมันโดยน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 5 กรัม) นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.3 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปปั่นเพื่อแยกส่วนของกากมันกับสารละลายออกจากกันด้วยถุงกรองซึ่งใส่ไว้ในกระบอกปั่นของเครื่องปั่นแยกด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรของสารละลายทั้งหมด แบ่งสารละลายที่ผ่านขั้นตอนการเกิดลิเคอแฟคชั่นและได้แยกส่วนของกากมันออกไปแล้ว (Liquor) ออกเป็นส่วนละ 50 มล. เพื่อนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ต่อไป แผนผังแสดงขั้นตอนการทดลองดังรูปที่ 2-4



รูปที่ 2-4 แผนผังแสดงขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ BAN และแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายมาทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ SPEZYME

2.1.3.4 การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้เกิดแซคคาริฟิเคชั่น โดยใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME)

หลังจากย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) เพื่อให้เกิดลิเคอแฟคชั่น เป็น LCP แล้ว จึงนำไปเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่จัดเตรียมให้มี แอคติวิตีตามที่กำหนด นำไปบ่มต่อในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 3, 6 ชม. และ ทุก ๆ 12 ชม. จนครบ 72 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มล. โดยปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ทันที ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ จากนั้นจึงนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำส่วนสารละลายดังกล่าวไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์, น้ำตาลกลูโคส และปริมาณของแข็งในสารละลาย

2.2 แผนการดำเนินงานวิจัย

2.2.1 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด

2.2.1.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวรัส

เนื่องจากกรดซัลฟิวรัสที่นำมาใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นต่ำ ประมาณ 0.05 โมลาร์ ดังนั้นในการย่อยกากมันสำปะหลังไม่แปรระดับความเข้มข้นกรดซัลฟิวรัส แต่จะแปรเฉพาะปริมาตรกรดซัลฟิวรัสที่ใช้เป็น 3 ระดับ คือ 40, 20 และ 10 มล. อย่างละ 2 ซ้ำ รวมเป็น 6 ตัวอย่าง เพื่อดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.2.1

ผลการทดลองที่ได้นำมาประเมินถึงความเป็นไปได้ของการนำกรดซัลฟิวรัสไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดออกซาลิก

2.2.1.2.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นและปริมาตรกรดออกซาลิกต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังสำหรับการทดลองที่มีการแปรความเข้มข้นกรดออกซาลิกออกเป็น 3 ระดับ คือ 2.0, 1.0 และ 0.5 โมลาร์ ซึ่งในแต่ละระดับความเข้มข้นทำการแปรปริมาตรกรดแตกต่างกันอีก 3 ระดับ คือ 40, 20 และ 10 มล. รวมเป็น 9 สภาวะ

และแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ รวมทั้งสิ้นเท่ากับ 18 ตัวอย่าง เพื่อดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.2.1

จากผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ จะได้สภาวะของการย่อยกากมันด้วยกรดออกซาลิกที่มีระดับความเข้มข้นและปริมาตรที่เหมาะสม รวมทั้งจำนวนครั้งของการล้างตะกอนที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการย่อยกากมันด้วยกรดออกซาลิกที่มีการแปรอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยตามแผนการดำเนินงานวิจัยข้อ 2.2.1.2.2 ต่อไป

2.2.1.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดออกซาลิก

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังโดยเติมกรดออกซาลิกที่มีระดับความเข้มข้นและปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการทดลองแปรอุณหภูมิในการย่อยออกเป็น 2 ระดับ คือ 121 และ 115 องศาเซลเซียส โดยแต่ละระดับอุณหภูมิทำการแปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 8 ช่วง คือ 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที ซึ่งแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำรวมทั้งสิ้นเป็น 36 ตัวอย่าง เพื่อดำเนินการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.2.2

ผลการทดลองที่ได้สามารถนำมาพิจารณาหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดออกซาลิก

2.2.1.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

2.2.1.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นและปริมาตรกรดซัลฟิวริกต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

2.2.1.3.1.1 กรดซัลฟิวริกที่มีคุณภาพระดับ เกรดวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่มีการแปรความเข้มข้นกรดออกเป็น 3 ระดับ คือ 2.0, 1.0 และ 0.16 โมลาร์ ซึ่งในแต่ละระดับความเข้มข้นทำการแปรปริมาตรกรดแตกต่างกันอีก 3 ระดับ คือ 40, 20 และ 10 มล. รวมเป็น 9 สภาวะ และแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ รวมทั้งสิ้นเท่ากับ 18 ตัวอย่าง เพื่อดำเนินการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.2.1

2.2.1.3.1.2 กรดซัลฟิวริกที่มีคุณภาพระดับ เกรดทางการค้า

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับแผนการทดลอง 2.2.1.3.1.1 แต่เปลี่ยนกรดซัลฟิวริกที่ใช้จาก เกรดวิเคราะห์เป็น เกรดทางการค้า

นำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตระหว่างการใช้กรดซัลฟิวริกที่มีคุณภาพต่างกัน (เกรดวิเคราะห์ และ เกรดทางการค้า) เพื่อเลือกชนิดของกรดซัลฟิวริกและสภาวะการผลิตที่มีความเข้มข้นและปริมาตรกรดที่เหมาะสม รวมทั้งพิจารณาจำนวนครั้งของการล้างตะกอนที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการย่อยกากมันด้วยกรดซัลฟิวริกที่มีการแปรอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยตามแผนการดำเนินงานวิจัยข้อ 2.2.1.3.2 ต่อไป

2.2.1.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

ใช้สภาวะที่เหมาะสมตามแผนการดำเนินงานวิจัยข้อ 2.2.1.3.1 เพื่อเตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังสำหรับการทดลองแปรอุณหภูมิในการย่อยออกเป็น 4 ระดับ คือ 100, 110, 115 และ 121 องศาเซลเซียส โดยแต่ละระดับอุณหภูมิทำการแปรระยะเวลาในการย่อยออกเป็น 8 ช่วง คือ 5 , 10 , 15 , 30 , 45 , 60 ,75 และ 90 นาที ซึ่งแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ และดำเนินการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.1.2.2

2.2.1.3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่มีการแปรระดับความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก เป็น 2 ระดับ คือ 2.0 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มล. นำไปย่อยภายใต้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่มีการแปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 8 ช่วง คือ 5 , 30 และทุก ๆ 15 นาทีจนครบ 120 นาที ซึ่งแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ รวมทั้งสิ้นเป็น 32 ตัวอย่าง เพื่อดำเนินการทดลองตามวิธีทดลองข้อ 2.1.2.2

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาร่วมกับผลการทดลองตามแผนการทดลองข้อ 2.2.1.3.2 หาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

2.2.1.4 การศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตต่อประสิทธิภาพในการผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังภายใต้สภาวะที่คัดเลือก

เพิ่มปริมาณการผลิตด้วยการเตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง 125 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง (เท่ากับน้ำหนักของกากมันสดความชื้น 72 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 0.5 กิโลกรัม) นำมา

ย่อยด้วยสภาวะที่คัดเลือกโดยพิจารณาจากสภาวะทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษาตามแผนการดำเนินงานวิจัยมาโดยลำดับ

ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษาในระดับต้นแบบ (กากมัน 5 กรัม) ซึ่งสามารถนำไปพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้

2.2.2 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

2.2.2.1 การศึกษาผลของปริมาณ เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยกากมัน

สำปะหลังต่อค่าสมมูลเดกซ์โทรส

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังและดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.1 โดยแปรปริมาณเอนไซม์ BAN ที่ใช้เท่ากับ 250, 500, 750 และ 1000 หน่วย (หน่วยของเอนไซม์ นิยามตามหน่วย SDU ดังภาคผนวก ค) อย่างละ 2 ซ้ำ นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 20 นาที จนครบ 120 นาที หยุดปฏิกิริยาและคั้นแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณของแข็งในสารละลาย(solid content) เพื่อคำนวณค่าสมมูลเดกซ์โทรส

ผลการทดลองที่ได้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) กับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย เพื่อใช้ในการเตรียมกากมันให้มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสได้ตามที่ต้องการ

2.2.2.2 การศึกษาผลของค่าสมมูลเดกซ์โทรสเริ่มต้นต่อการการเกิดแซคคาริฟิเคชั่นของกากมันสำปะหลัง เมื่อนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME)

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังและดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.1 ให้มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสเริ่มต้นเท่ากับ 28, 30 และ 33 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) 500 หน่วย ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 20, 40 และ 60 นาทีตามลำดับ ซึ่งแต่ละสภาวะจัดเตรียมเป็น 4 ซ้ำ โดยแบ่งออก 2 ชุดทดลองจึงประกอบด้วย 3 สภาวะ สภาวะละ 2 ซ้ำ หลังจากปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.3 เก็บตัวอย่างจากทุกหน่วยทดลองไว้เป็นชุดควบคุมที่เวลา 0 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 2.1.3.4 ตัวอย่างกากมันสำปะหลังชุดที่ 1 เติมเอนไซม์ SPEZYME ประมาณ 300 หน่วย และชุดที่ 2 เติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) 1500 หน่วย (หน่วยของเอนไซม์ นิยามตามหน่วย SDU ดังภาคผนวก ง)

ผลการทดลองที่ได้จะทำให้ทราบถึงค่าสมมูลเดกซ์โทรสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเกิดแซคคาริฟิเคชั่นของกากมันสำปะหลัง

2.2.2.3 การศึกษาปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่ทำให้กากมันสำปะหลังเกิดแซคคาริฟิเคชั่นได้สมบูรณ์

ก. เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังและดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.1 โดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) 500 หน่วย ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 40 นาที แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 16 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างจากทั้ง 3 ชุด ชุดละ 2 ซ้ำ ไว้เป็นชุดควบคุมที่เวลา 0 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดลองต่อไปตามวิธีการข้อ 2.1.3.4 ที่มีการแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ให้มี แอคติวิตี 300, 450 และ 600 หน่วย เติมลงไปในแต่ละชุดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่มีการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 6 และทุก ๆ 12 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาหาแนวทางการปรับปรุงการทดลองและแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่ใช้ลดลง

ข. เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังและดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.2 โดยใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ BAN) 500 หน่วย ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 40 นาที จากนั้นดำเนินการทดลองต่อไปเช่นเดียวกับแผนการทดลองข้อ 2.2.2.3ก ที่มีการแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ให้มี แอคติวิตี 75, 150 และ 300 หน่วย

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

2.2.2.4 การแยกเอาเฉพาะส่วนสารละลายจากการเกิดลิเคอแฟคชั่น (liquor) ของกากมันสำปะหลังมาศึกษาปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่ทำให้เกิดแซคคาริฟิเคชั่นได้สมบูรณ์

ก. เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง 15 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) เติมน้ำขจัดไอออน 150 มล. แล้วดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.3 ซึ่งจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ ทำการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) 1500 หน่วย เป็นเวลา 40 นาที หลังจากปั่นแยกสารละลายออกจากกากมันแบ่งสารละลายที่ได้เป็น 3 ส่วน ส่วนละ 50 มล. เพื่อนำไปทดลองต่อไปตามวิธีการข้อ 2.1.3.4 ที่มีการแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ให้มีแอคติวิตี 150, 240 และ 600 หน่วย

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาหาแนวทางการปรับปรุงการทดลองและแปร ปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่ใช้ลดลง

ข. เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง 10 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) เติมน้ำขจัดไอออน 100 มล. แล้วดำเนินการทดลองตามวิธีการข้อ 2.1.3.3 ซึ่งจัดเตรียมเป็น 2 ซ้ำ ทำการย่อยด้วยเอน ไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) 1000 หน่วย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากปั่นแยกสารละลายออก จากกากมันแบ่งสารละลายที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนละ 50 มล. เพื่อนำไปทดลองต่อไปตามวิธีการข้อ 2.1.3.4 ที่มีการแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ให้มีแอคติวตี 25 และ 75 หน่วย

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาหาแนวทางการปรับปรุงการทดลองและแปร ปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ที่ใช้ลดลง

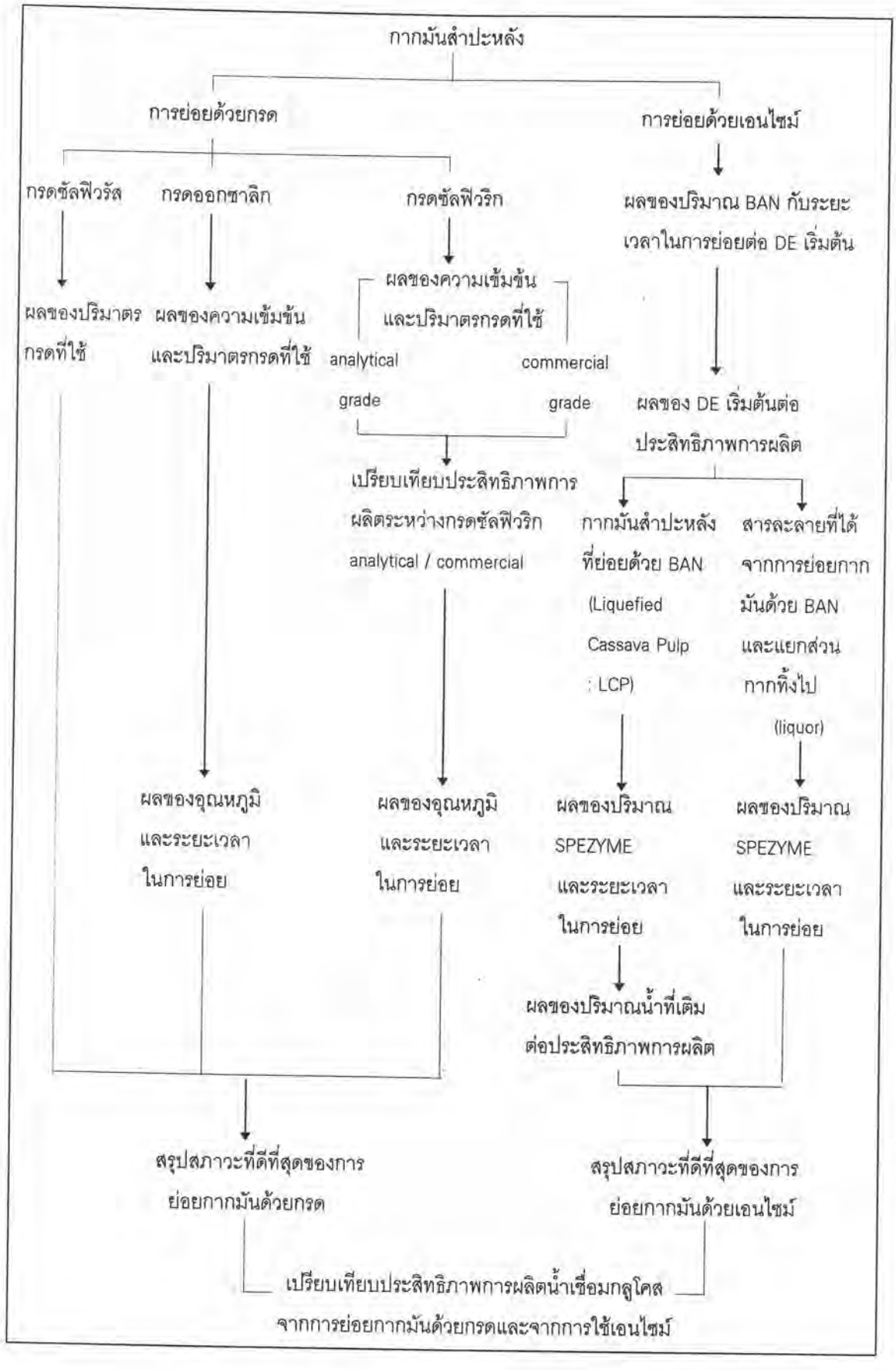
ค. เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง 15 กรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) เติมน้ำผสมด่างที่ เตรียมตามวิธีการข้อ 2.1.3.2 ปริมาตร 150 มล. แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการตามแผนการ ทดลองข้อ 2.2.2.4ข โดยแปรปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) ให้มีแอคติ วตี 75, 150 และ 300 หน่วย

ผลการทดลองที่ได้นำมาพิจารณาร่วมกับผลการทดลองตามแผนการทดลองข้อ 2.2.2.3 เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดและใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยที่สุดสำหรับการย่อยกากมันสำปะหลัง

2.2.2.5 การศึกษาผลของปริมาตรน้ำที่เติมลงในกากมันสำปะหลังต่อประสิทธิภาพในการ ผลิตน้ำเชื่อมกลูโคสด้วยเอนไซม์

เตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลังตามวิธีการทดลองข้อ 2.13.2 โดยแปรปริมาตรน้ำ ที่เติมลงไปในกากมันสำปะหลังเป็น 5 ระดับ คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 มล. ทำการย่อยด้วยเอน ไซม์อะไมเลส (เอนไซม์ BAN) 500 หน่วย เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นดำเนินการทดลองต่อไปตาม วิธีการข้อ 2.1.3.4 โดยใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (เอนไซม์ SPEZYME) 300 หน่วย ทำการย่อย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สรุปขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยไว้ดังรูปที่ 2-5



รูปที่ 2-5 แผนผังการทดลองทั้งหมดของงานวิจัย

2.3 การวิเคราะห์

2.3.1 การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ พี.จี.โอ. (Huggett and Nixon, 1957)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.04-0.16 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ. (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ใช้น้ำกำจัดไอออนผ่านขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรได้จากกราฟมาตรฐาน น้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.16 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ฉ1)

2.3.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld ,1955)

ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก2) ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที แล้วเติมน้ำกำจัดไอออน 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกำจัดไอออนผ่านขั้นตอนข้างต้นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ได้จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ฉ2)

2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งในสารละลาย

ปิเปตต์สารละลายที่มีสภาพเป็นกลาง 1 มล. ใส่ในกระทงอลูมินั่มฟรอย์ที่ทราบน้ำหนักกระทงที่แน่นอน นำไปอบจนแห้งสนิทในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน เดสิเคเตอร์ก่อนนำไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด นำน้ำหนักที่ชั่งได้ลบด้วยน้ำหนักของกระทงอลูมินั่มฟรอย์จะได้ปริมาณของแข็งในสารละลาย

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องมือชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองได้รวบรวมและแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงเครื่องมือ รุ่น และบริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV-160	Shimadzu, Japan
2. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath sheker)	G-86	New Brunswick Scientific Co. Inc., New York, USA
3. เครื่องเขย่า	Vortex-Genie NO. 2	Scientific Industries Inc., New York, USA.
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	501	Sentron, Japan
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave)	HA-26	Hirayama Manufacturing, Tokyo, Japan.
6.เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporation)	RE-52	Yamato Scientific, Tokyo, Japan.
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (Centrifuge)	KR-20000T	Kubota, Tokyo, Japan.
8. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์	Elgastat UHQII	Elgastat, England.
9. เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic Balance)	FX-3000	A&D, Japan
10. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic Balance)	FX-180A	A&D, Japan

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองได้รวบรวมและแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 รายชื่อเคมีภัณฑ์และบริษัทผู้ผลิต

เคมีภัณฑ์	บริษัทผู้ผลิต	
กากมันสำปะหลัง	ไทยวา	ประเทศไทย
กรดซัลฟิวรัส	ไทยวา	ประเทศไทย
กรดซัลฟิวริก (เกรดวิเคราะห์)	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟิวริก (เกรดทางการค้า)	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	J.T. BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดมาลิอิค	MERCK	ประเทศเยอรมัน
กรดออกซาลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะซีติก	BDH CHEMICAL	ประเทศอังกฤษ
กรดไฮโรคลอริก	EAST ASIATIC	ประเทศไทย
แคลเซียมคาร์บอเนต (OMECA grade)	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมอะซีเตต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ทริส (ไฮดรอกซีเมธิล)-อะมิโนมีเธน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ออโธ-ไดอะนิซิดีน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอธานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์ พี.จี.โอ.	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์อะไมเลส (BAN)	NOVO NORDISK	ประเทศเดนมาร์ก
เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส(SPEZYME GA 30N)	GENENCOR	ประเทศฟินแลนด์