บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น Sartorius C244S บริษัท Scientific Promotion
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Denver basic บริษัท Thaivictory
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น MPW 350R บริษัท Scientific Promotion
4. จานเพาะเชื้อ
5. ฟลาสก์ขนาด ต่าง ๆ
6. ไมโครปิเปตขนาด ต่าง ๆ
7. ปิเปตขนาดต่าง ๆ
8. บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ
9. เทอร์โมมิเตอร์
10. หลอดทดลองและหลอดปั่นเหวี่ยง
11. เครื่อง UV- visible light spectrophotometer รุ่น GVC cintra 40 บริษัท Scientific Promotion
12. ปฏิกรณ์ชีวภาพแก้วขนาด 4 ลิตร
13. ปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร (in – house design)
14. กระบอกตวงขนาด ต่าง ๆ
15. ถังต้มอาหาร
16. เครื่องวัดความหนืด รุ่น Brookflied DV III บริษัท Scientific Promotion
17. อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Julabo TW20 บริษัท Scientific Promotion

สารเคมี และวัตถุดิบ

1. เอนไซม์เทอร์มามิล (Termamyl 120; Novo Nordisk Co., Bagsvaerd Denmark)

ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* มีแอคติวิตี 120 Kilo Novo alphaamylase Unit (KNU) ต่อกรัม (1 KNU คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง 5.26 กรัมต่อชั่วโมง ตามวิธีมาตรฐานของบริษัท Novo Nordisk (Denmark) ที่ภาวะดังนี้ แป้งอยู่ในรูปของสารละลายซึ่งมีแคลเซียม

0.0043 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.6 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเวลาของการย่อยอยู่ในช่วงระหว่าง 7 ถึง 20 นาที)

2. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เอนไซม์ AMG (AMG 300L; Novo Nordisk Co., Bagsvaerd Denmark) ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีแอคติวิตี 300 Amyloglucosidase Unit (AMG) ต่อมิลลิลิตร

3. แป้งมันปะหลังตราปลาไทยห้าดาว ของบริษัท อี.ที.ซี. เอี้ยบตงจั่น จำกัด

4. มันเส้นจากโรงงานชลบุรีการเกษตร อ.เมือง จ. ชลบุรี

5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ก)

วิธีดำเนินการวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งทางสารเคมี

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งโดยการใช้กรด

1.1 ชั่งแป้งมันปะหลังชนิดละ 0.35 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องไมโครเวฟแล้วนำออกมาคนเป็นระยะ ๆ จนได้สารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ซึ่งจะได้สารละลายแป้งมันปะหลังสุกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

1.2 จากนั้นนำสารละลายมันปะหลังเติมลงในหลอดทดลองหลอดละ 4 มิลลิลิตร แล้วนั้นนำมาทำการสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการใช้กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก (ความเข้มข้น 0.5 และ 1 N) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 90, 95 และ 98 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และที่เวลาในการย่อยสลาย 5, 10, 15 และ 20 นาที

1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนและสารที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอนขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 3-2 ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS กรณีมันเส้นก็ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และ 1.2 แต่เปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังเป็นมันเส้น (ในรูปมันเส้นผงบดละเอียด)

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งมันทางชีวภาพ

1. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายย่อยแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นโดยเอนไซม์เทอร์มามิล ในการย่อยครั้งแรก

1.1 ชั่งแป้งมันปะหลัง ชนิดละ 0.35 กรัม เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร ซึ่งผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องไมโครเวฟแล้วนำออกมาคนเป็นระยะ ๆ จนได้สารละลาย

ใส จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรซึ่งจะได้สารละลายแป้งมันปะหลังและ มันเส้นสุกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

1.2 นำสารละลายแป้งมันสำปะหลังและ มันเส้นสุกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายปฏิกิริยา 3 ระดับ คือ 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

1.3 ใส่เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 90, 95 และ 98 องศาเซลเซียส

1.4 หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายเมอร์คิวริ่คลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้โปรตีนและสารที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอนขั้นตอนการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 3-3

1.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS แบลงค์ (blank) ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.6 ทำการศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล

นำสารละลายแป้งมันสำปะหลังสุกความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตรมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 15 ไมโครลิตรที่ความเป็นกรด-ด่าง ตามข้อ 1.2 และ อุณหภูมิตามข้อ 1.3 เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้โปรตีนและสารที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอน วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

1.7 กรณีมันเส้นก็ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 และ3.1.2 แต่เปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังเป็นมันเส้น

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งโดยการใช้เอนไซม์กลูโคสอะไมเลสในครั้งสุดท้าย

2.1 โดยนำสารละลายแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นสุกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด- ด่างของ สารละลายเป็น 3 ระดับ คือ 4.0, 4.5 และ 5.5 ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์

2.2 จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดสอบขนาด ความจุ 14 x160 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส

2.3 หยุดปฏิกิริยาโดยต้มน้ำเดือด 20 นาที ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้โปรตีนและสารที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอน ขั้นตอนการทดลองแสดงดังภาพ 3- 4

2.4 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS แบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

2.5 เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมก็ทำการศึกษาจลนศาสตร์ (kinetics) ของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยนำสารละลายแป้งมันสำปะหลังและมันเส้นสุก ความเข้มข้น 0.1 ถึง 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์เทอร์มามิลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 15 ไมโครลิตรที่ความเป็นกรด-ด่าง ตามข้อ 2.1 และอุณหภูมิ ตามข้อ 2.2 เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แบลงค์ใช้ น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งโดยขยายขนาดการทดลองเป็นปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดความจุ 4 ลิตร

3.1 ศึกษาวิธีการและผลของการกวนผสม (mixing) ที่มีต่อการย่อยสลายแป้ง

นำสภาวะที่ได้จากข้อ 3.2 มาศึกษาวิธีการและผลของการกวนผสม (mixing) ที่มีการย่อยสลายแป้ง ที่สภาวะต่าง ๆ กัน คือ

ถังที่ 1 แป้งแขวนลอยในน้ำทำให้สุกก่อนแล้วจึงย่อยด้วยเอนไซม์

ถังที่ 2 แป้งแขวนลอยในน้ำผสมเอนไซม์แล้วให้ความร้อน

ถังที่ 3 แป้งแขวนลอยในน้ำทำให้สุกก่อนแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ ขณะย่อยกวนด้วยใบพัด Ekato Intermig ความเร็ว 200 รอบ/นาที

ถังที่ 4 แป้งแขวนลอยในน้ำผสมเอนไซม์แล้วให้ความร้อนขณะย่อยกวนด้วยใบพัด Ekato Intermig ความเร็ว 200 รอบ/นาที

แต่ละการทดลองทำการสลายเป็นเวลา 180 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้โปรตีนและสารที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

3.2 ศึกษาการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล (โดยมีปริมาณแป้งและปริมาณเอนไซม์คงที่)

นำสภาวะจากข้อ 3.1 มาศึกษาการย่อยสลายแป้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ

ถังที่ 1 ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ลิตร เติมเอนไซม์เทอร์มามิลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.125 มิลลิลิตร

ถังที่ 2 ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ลิตร เติมเอนไซม์เทอร์มามิลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.156 มิลลิลิตร

ถังที่ 3 ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 ลิตร เติมเอนไซม์เทอร์มามิลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.188 มิลลิลิตร

แต่ละการทดลองทำการสลายแป้งเป็นเวลา 180 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น และหาค่า DE

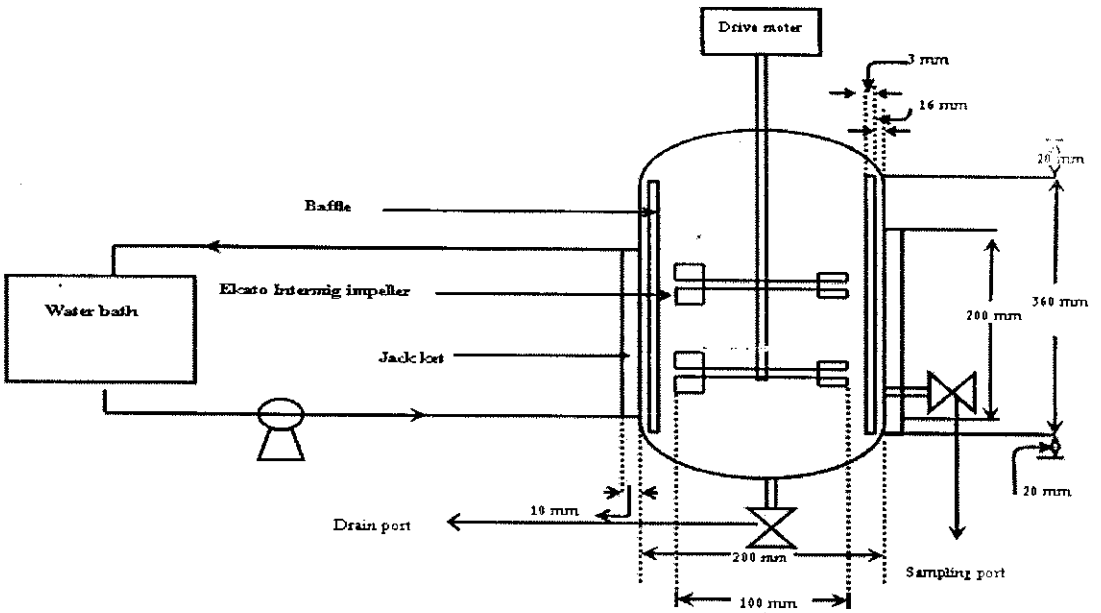
4. การขยายขนาดการสลายแป้งโดยทำการทดลองในปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดความจุ 10 ลิตร

4.1 ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (ภาพที่ 3-1) จากการทดลองข้างต้น มาขยายการทดลองในปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดความจุ 10 ลิตร โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตที่ได้กับกลศาสตร์ที่เกิดขึ้นในปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยทำการกวนผสมด้วย Ekato Intermig 2 ใบ ที่ความเร็ว 200, 300 และ 400 รอบ/นาที หรือเท่ากับพลังงานต่อหน่วยน้ำหนักของของเหลว (power input) = 0.0004, 0.0015 และ 0.0031 วัตต์/กิโลกรัม

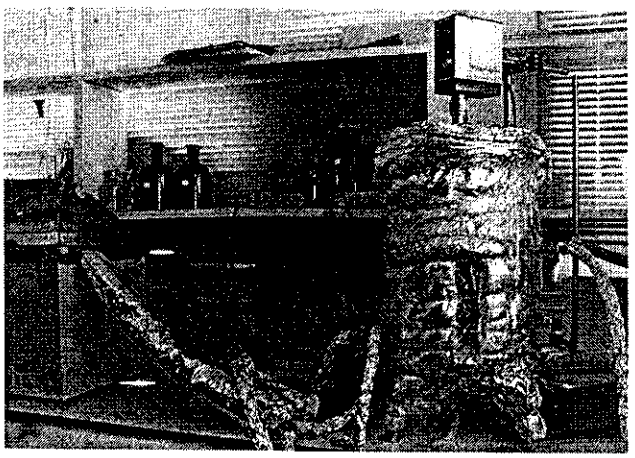
4.2 ในการศึกษาข้อ 3.3.5.1 คำนวณค่าพลังงาน (power) และ power input คำนวณได้จากสมการที่ (2) ถึง (4) ในหัวข้อที่ 8.3 รูปแบบของข้อมูลผลการทดลองที่ได้จะเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของระบบ และสามารถใช้เป็นอ้างอิง สำหรับการขยายส่วนต่อไป ทำการทดลองซ้ำเพื่อดูการทดลองที่ทำซ้ำได้ (reproducibility) เพื่อให้แน่ใจว่า การทดลองนั้นได้ผลถูกต้องในกรณีที่มีการคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นจำเป็นที่จะต้องทำการแก้ไขให้ถูกต้อง (validation) ทำซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะใช้สำหรับใช้เป็นข้อมูลที่จะใช้สำหรับในการขยายขนาดการผลิตต่อไป

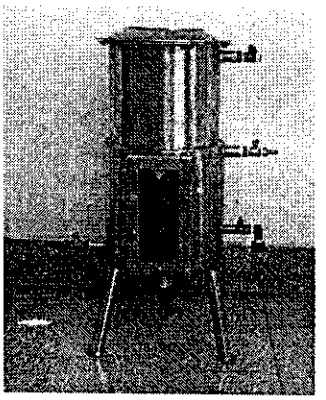
ก. ใบพัด Ekato Intermig

ภาพที่ 3-1 องค์ประกอบต่าง ๆ ในการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล



ข. ไดอะแกรมปฏิกรณ์ชีวภาพความจุ 10 ลิตร และอุปกรณ์ประกอบ

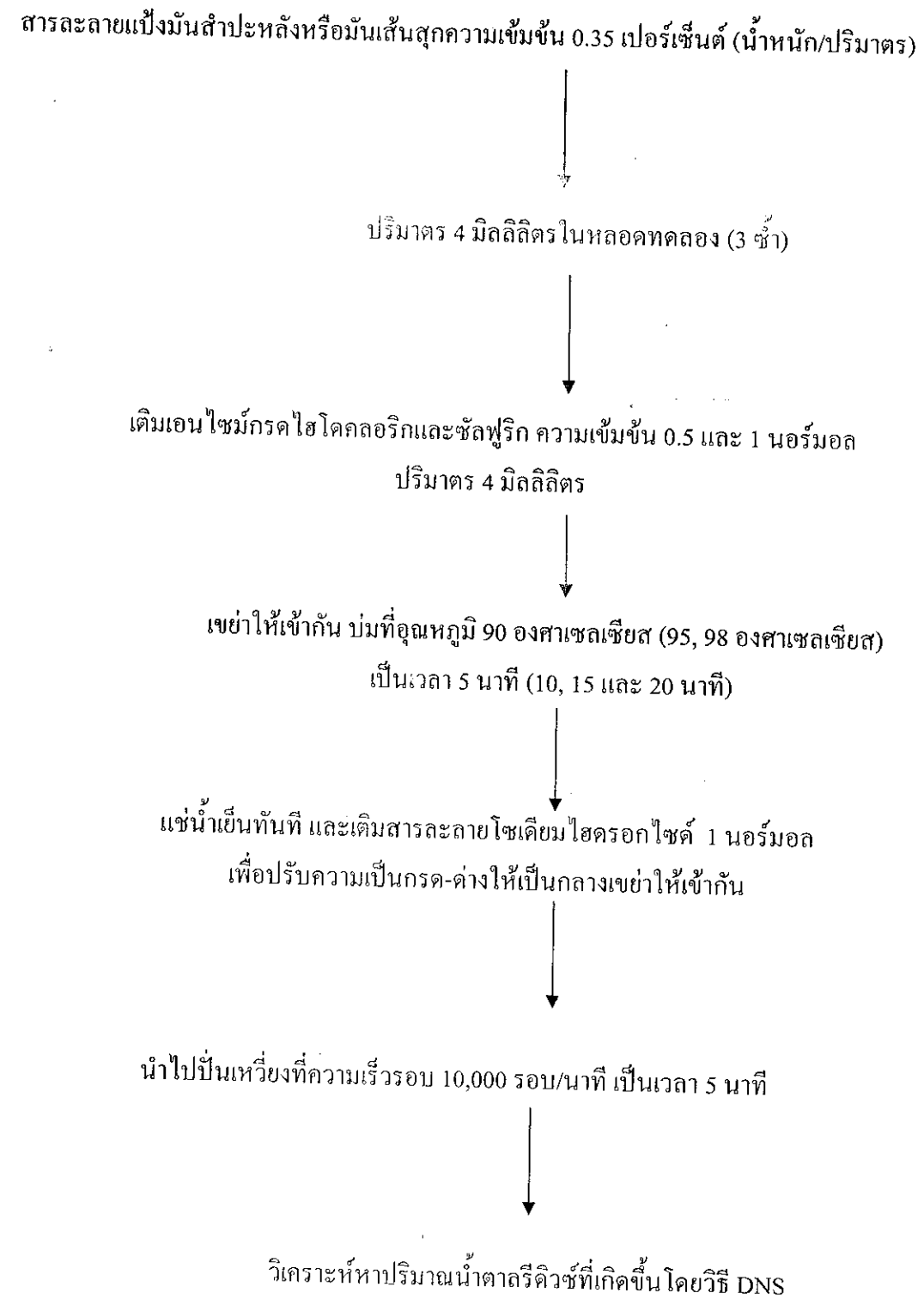




ค. ปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร

ง. ปฏิกรณ์ชีวภาพความจุ 10 ลิตรที่หุ้มฉนวนกันความร้อน และอุปกรณ์ประกอบ

ภาพที่ 3-1 (ต่อ)



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งมันสำปะหลังหรือมันเส้นด้วยกรด (ดัดแปลงจาก Kim & Himdy, 1984)

สารละลายแป้งมันสำปะหลัง หรือมันเส้นความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์(ปริมาตร/ปริมาตร)

↓

ปริมาณ 4 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง (3 ซ้ำ)
และปรับค่าความกรด-ด่างต่าง ๆ

↓

เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็น (ปริมาตร/ปริมาตร)
ปริมาตร 15 ไมโครลิตร

↓

เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (95, 98 องศาเซลเซียส)
เป็นเวลา 5 นาที (10, 15 และ 20 นาที)

↓

เติมสารละลาย 0.4 mM $HgCl_2$ ปริมาณ 4 มิลลิลิตร

↓

เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

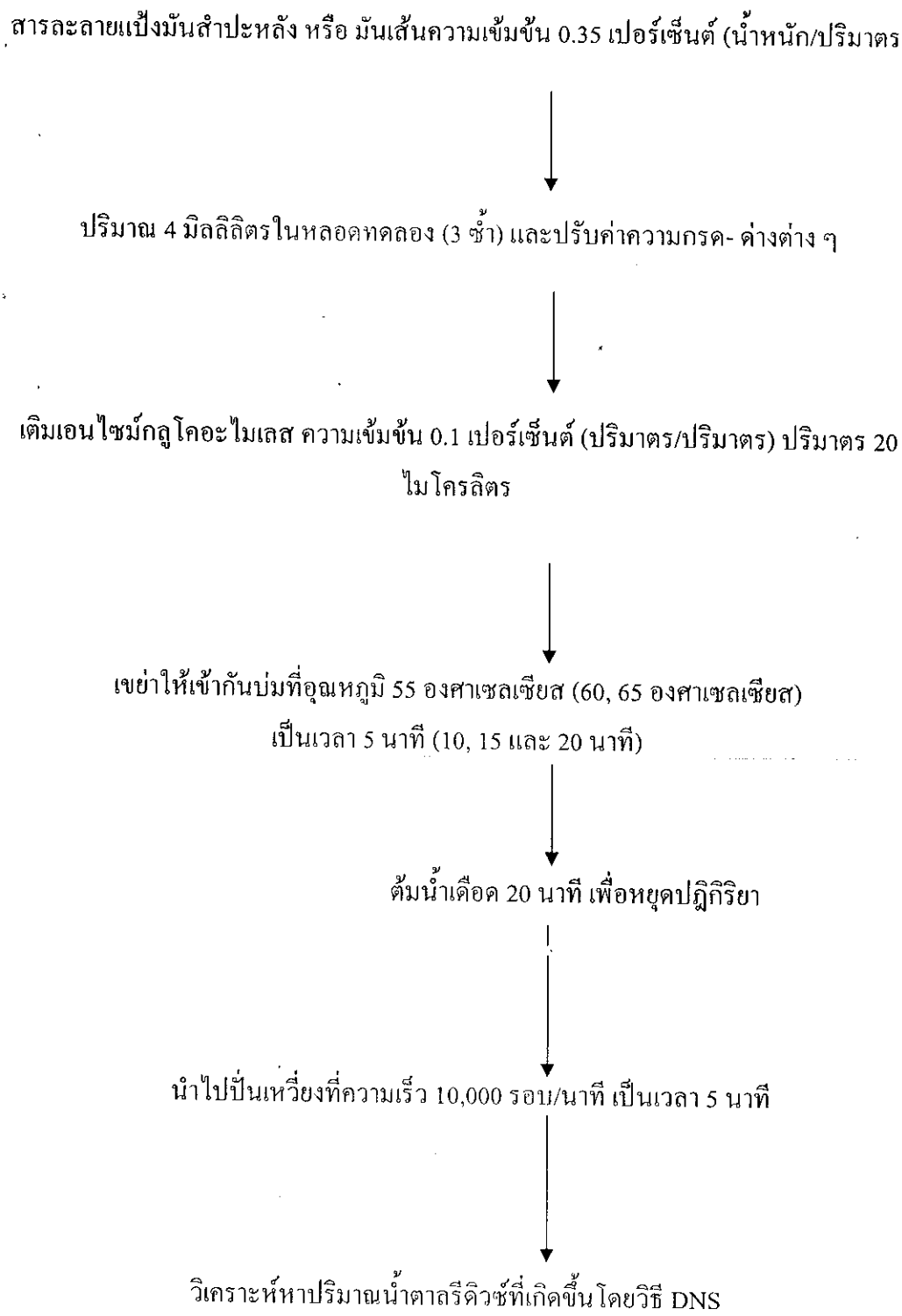
↓

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

↓

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดย วิธี DNS

ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งมันสำปะหลังหรือมันเส้นโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หรือเอนไซม์เทอร์มามิล ในการย่อยครั้งแรก (ดัดแปลงจากกล้าณรงค์ ศรีรอตและคณะ, 2544)



ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสลายแป้งมันสำปะหลังหรือมันเส้นโดยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการย่อยครั้งสุดท้าย (ดัดแปลงจาก เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์และคณะ, 2545)

5. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.1 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิธี DNS

5.1.1 ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออกแล้ว) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

5.1.2 จากนั้นนำไปเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรนำไปต้มในน้ำร้อน 5 นาทีเพื่อทำปฏิกิริยาจากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

5.1.3 เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดหาความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

5.1.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน หาค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจากความเข้มข้นของกลูโคส(กรัม/ลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้)} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

5.2 การหาปริมาณค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE)

นำภาชนะที่ใส่ตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อไล่ความชื้น ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจากนั้นนำไปชั่งจดน้ำหนักก่อนชั่ง จากนั้นดูดตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง จดบันทึกน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือจากการอบไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจากนั้นนำไปชั่งอีกครั้ง และบันทึกน้ำหนักของแข็งที่ได้ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า DE

$$DE = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}} \times 100$$