บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

วัตถุดิบทั้งหมดในการวิจัยแสดงในตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดของวัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดของวัตถุดิบ	ชื่อทางการค้า	ระดับ	บริษัทและประเทศที่ผลิต	แอคติวิตีจำเพาะ
แป้งข้าวเจ้า	นิวเกรด	-	ไทยวา จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย	-
แอลฟา-อะมิเลส	แอลฟา-อะมิเลส (A-3403)	A.R	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา	15,500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (1 ยูนิตสามารถย่อยแป้งได้มอลโตส1มิลลิกรัมในเวลา 3 นาที เมื่อความเป็นกรดด่าง 6.9 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)
กลูโคอะมิเลส	อะมิโลกลูโคซิเดส (A-7255)	A.R	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา	12,100 ยูนิตต่อกรัม(1ยูนิตสามารถย่อยแป้งได้กลูโคส 1 มิลลิกรัม ในเวลา 3 นาที เมื่อความเป็นกรดด่าง 4.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดในการวิจัยแสดงในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.2 รายละเอียดของสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชนิด	ระดับ	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด		
1.1 เอทธานอล	A.R.	May&Baker Ltd. Dagrenham. อังกฤษ
1.2 กรดอะซิติก	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
1.3 ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
1.4 กลูโคอะมิเลส(A-3042 แอคติวิตีจำเพาะ 7,100 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร)	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
1.5 โซเดียมอะซิเตรท	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์กลูโคส		
2.1 แอนไฮโดรกลูโคส	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
2.2 โอไดอะนิซิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
2.3 PGO-enzyme (หมายเลขแคตตาลอก 510-6)	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์		
3.1 แอมโมเนียมโมลิบเดรท	A.R.	Sigma chemical company สหรัฐอเมริกา
3.2 คอปเปอร์ซัลเฟท	A.R.	Fluka AG. สวิตเซอร์แลนด์
3.3 โปแทสเซียมโซเดียม ทาร์เทท เตตระไฮเดรท	A.R.	Sigma chemical company สหรัฐอเมริกา
3.4 โซเดียมคาร์บอเนต	A.R.	Merck-Schucharat เยอรมัน

ชนิด	ระดับ	บริษัทและประเทศผู้ผลิต
3.5 โซเดียมไฮโดเจนคาร์บอเนต	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
3.6 โซเดียมซัลเฟท(แอนไฮดัส)	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
3.7 กรดซัลฟุริก	A.R.	Riedel-De Haen Ag Seelze เยอรมัน
4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ของแข็งที่หมักได้		
4.1 แอมโมเนียมฟอสเฟต	A.R.	Merck-Schucharat เยอรมัน
4.2 bottom brewer's yeast	A.R.	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
4.3 โปแทสเซียมฟอสเฟท	A.R.	Merck-Schucharat เยอรมัน
4.4 ยีสต์เอกซ์แทรก	A.R.	Diffco Laboratories สหรัฐอเมริกา
5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ของน้ำตาลด้วย HPLC		
6.1 อะซิโตไนไตรล์	HPLC	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
5.2 กลูโคส	HPLC	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
5.3 ฟรุกโตส	HPLC	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
5.4 มอลโตส	HPLC	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา
5.5 มอลโตไตรโอส	HPLC	Sigma Chemical Company สหรัฐอเมริกา

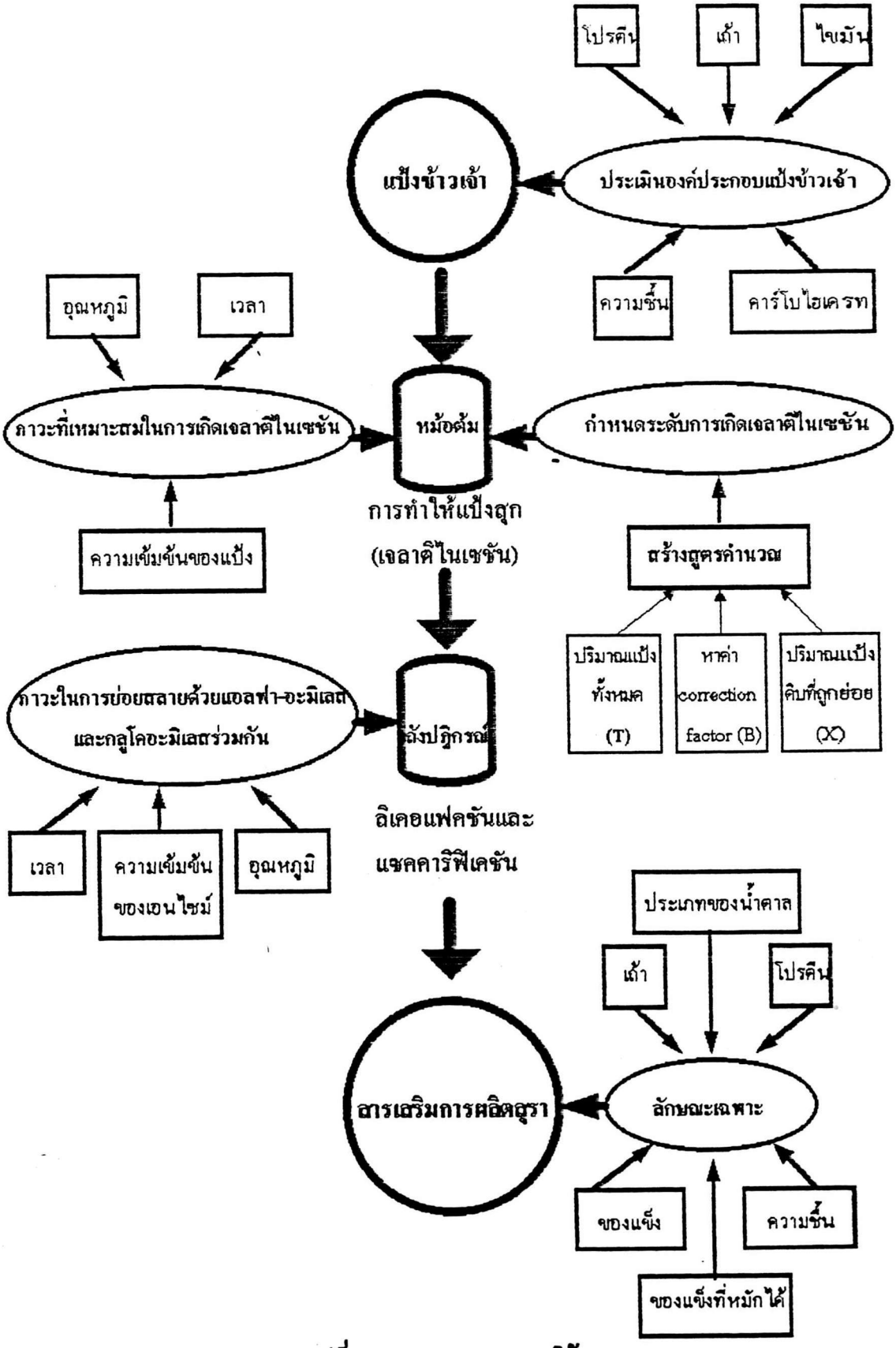
อุปกรณ์

อุปกรณ์ในการวิจัยแสดงในตาราง 3.3

ตารางที่ 3.3รายละเอียดของอุปรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ชนิด	ชื่อทางการค้า	รุ่น	บริษัท	ประเทศ	ตัวแทนจำหน่าย
เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดทยาบ	Precisa	180 A	PAG OERLJKON AG	สวิตเซอร์แลนด์	-
เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด	Sartorius	BA 21005	Sargent-Welch Scientific Company	สหรัฐอเมริกา	บริษัทไชแอนทิฟิกโปรโมชั่นจำกัด
เครื่องปั่นแยก	Sorvall	RC 5 C	Du Pont Company	สหรัฐอเมริกา	บริษัทดีทแฮล์มจำกัด
เครื่องเขย่า	Forna Scientufic	2569	Forma Scientific	-	-
เครื่องระเหยความชื้นสุญญากาศ	Rotavapor	RE-111	Buchi Laboratorium	สวิตเซอร์แลนด์	บริษัทเบคไทยกรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์จำกัด
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง	Milton Roy	Spectonic 1021	Milron Roy	ไอร์แลนด์	บริษัทไชทรอนิคจำกัด
ตู้อบ	Memmert	800	Memmert + GmbH+ Co.KG	เยอรมัน	บริษัทเจ็บเช่นแอนด์เจสเช่น (ประเทศไทย) จำกัด
เครื่องปั่นผสม	Seward	EA 7021	-	-	-

ชนิด	ชื่อทางการค้า	รุ่น	บริษัท	ประเทศ	ตัวแทนจำหน่าย
เครื่องหาความชื้น	Sartorius	YTC 012	Sargent-Welch Scientific Company	สหรัฐอเมริกา	บริษัทไซแอนทิฟิกโปรโมชั่นจำกัด
HPLC	Shimadzu	LC-3A	Shimadzu	ญี่ปุ่น	บริษัท พารา วินเซอร์จำกัด
เครื่องย่อยและกลั่นหาโปรตีน	Kjeldahl System	C315/ 425	Buchi Laboratorium	สวิตเซอร์แลนด์	บริษัทเบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
เครื่องสกัดไขมัน	Soxhlet-Fat Extraction Apparatus	B-810	Buchi Laboratorium	สวิตเซอร์แลนด์	บริษัทเบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
เครื่องหาเส้นใย	Tecator fibertec System	1017	Buchi Laboratorium	สวิตเซอร์แลนด์	บริษัทเบคไทย กรุงเทพอุปกรณ์เคมีภัณฑ์ จำกัด
เตาเผา	NEY	2-525 Seri's II	-	-	-
เครื่องปฏิกรณ์	Biostat M.	-	-	-	-
pH meter	Suntex	300	-	-	-



รูปที่ 3.1 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตการชั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเจ้า (ดังรายละเอียดอธิบายไว้ในภาคผนวก ก)

3.1.1 ความชื้น

3.1.2 โปรตีน

3.1.3 ไขมัน

3.1.4 เส้นใย

3.1.5 เถ้า

3.1.6 คาร์โบไฮเดรท

3.2 หาภาวะที่เหมาะสมในการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งข้าวเจ้าเพื่อใช้เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Shetty, Lineback และ Seib, 1975)

3.2.1 สร้างสูตรที่ใช้คำนวณระดับการเกิดเจลาติไนเซชัน

3.2.1.1 กำหนดภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบด้วยกลูโคอะมิเลส (A-3042, Sigma)

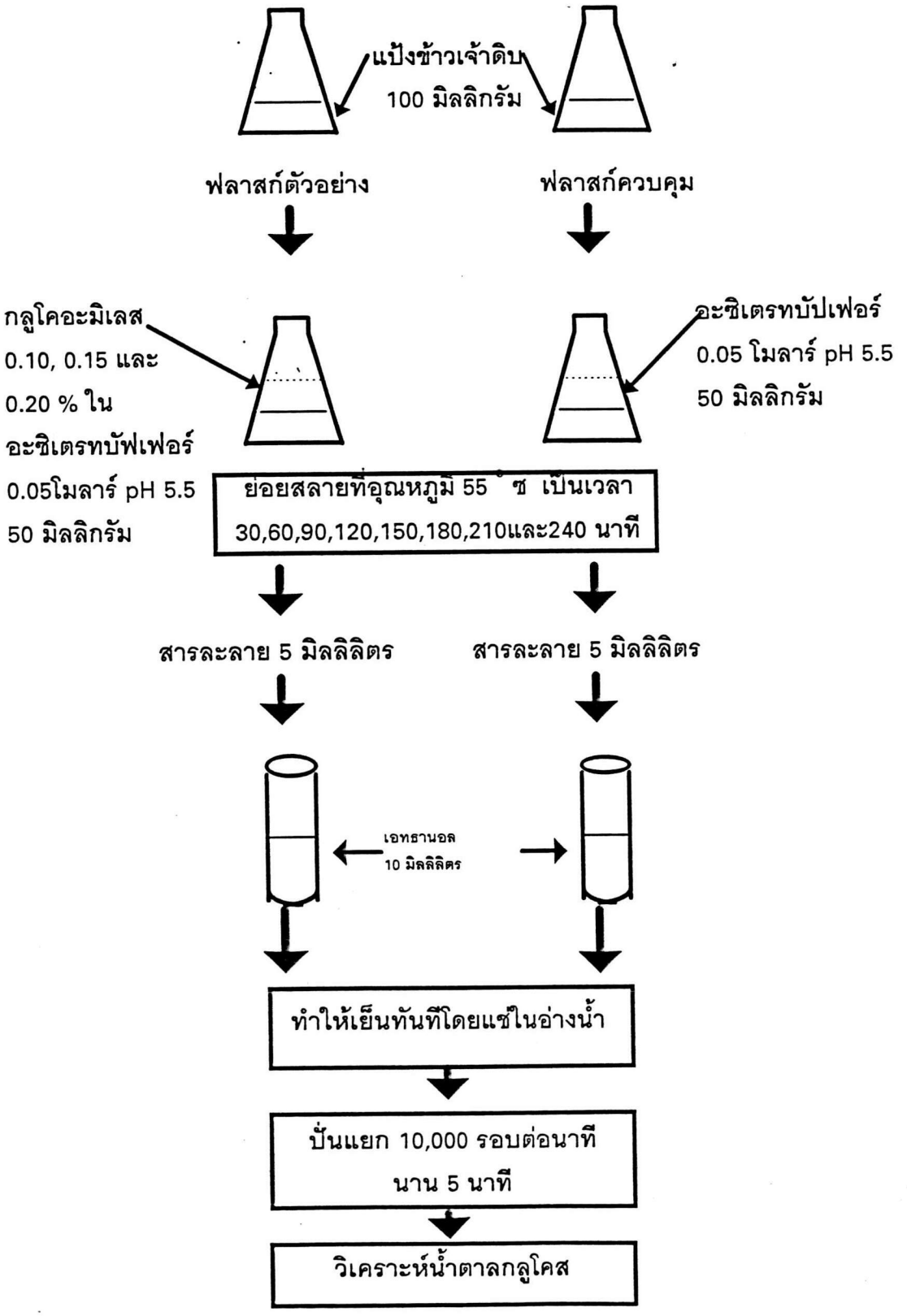
วิธีการทดลองแสดงดังรูป 3.2 นำแป้งข้าวเจ้าดิบ 100มิลลิกรัมและซิลิกาเจล 500 มิลลิกรัม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมสารละลายกลูโคอะมิเลสในอะซิเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปิเปตสารละลายมา 5 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีเอทธานอลบริสุทธิ์บรรจุอยู่ 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้สารละลายเย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง ปั่นแยกสารละลายที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใสปรับอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมวิเคราะห์กลูโคส (ภาคผนวก ข) ต่อไป การทดลองนี้ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคอะมิเลส 3 ระดับคือร้อยละ 0.10,0.15 และ0.20 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแป้ง และเวลาในการย่อยสลาย 8 ระดับ คือ 30,60,90,120,150,180,210 และ240 นาที เกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสมคือปริมาณกลูโคสสูงสุด

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric factorial design ขนาด 3x8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลองสองซ้ำ

3.2.1.2 หาค่า Correction factor (B) เพื่อสร้างสูตร

3.2.1.2.1 วิเคราะห์ร้อยละของแป้งดิบที่ถูกย่อยด้วยกลูโคอะมิเลส

ทดลองเช่นเดียวกับ 3.2.1.1 โดยใช้แป้งข้าวเจ้าดิบ 25,50,75 และ100 มิลลิกรัม ย่อยสลายด้วยกลูโคอะมิเลส ใช้ความเข้มข้นและเวลาในการย่อยสลายที่ได้จากข้อ 3.2.1.1



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการหาความเข้มข้นและเวลาในการย่อยแป้งข้าวเจ้าดิบด้วยกลูโคอะมิเลส

2.1.2.2 3.2.1.2.3 วิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch) ที่มีในแป้งข้าวเจ้า

ละลายแป้งข้าวเจ้า 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลายไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 90 โดยปริมาตรต่อปริมาตรในฟลาสก์ปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรควบคุมอุณหภูมิในการละลายเป็น 55 องศาเซลเซียส กวนสารละลายนาน 5 นาที ระหว่างนี้จะมีสารละลายบางส่วนระเหยออกไป ต้องปรับปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 100 มิลลิลิตรอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายจากฟลาสก์มา 1 มิลลิลิตร ย่อยด้วยกลูโคอะมิเลสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแป้งในอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 5.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 55 องศาเซลเซียส เวลา 120 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาโดยเติมเอทธานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร และทำให้สารละลายเย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง ปรับอุณหภูมิของสารละลายให้เป็น 37 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมวิเคราะห์กลูโคส (ภาคผนวก ข) ต่อไป

3.2.1.3 การทดสอบความถูกต้องของสูตร

เตรียมแป้งข้าวเจ้าที่เกิดเจลาติไนเซชันอย่างสมบูรณ์ โดยต้มสารละลายแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้นร้อยละ 2 ในหม้อต้มภายใต้ความดัน อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แยกน้ำออกจากแป้งด้วยการเติมเมทธานอล 3 เท่าของสารละลายแป้ง ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 120 วินาที เทส่วนของของเหลวทิ้ง เติมเมทธานอลอีกครั้งแต่ลดปริมาตรลงเป็น 2 เท่าของแป้ง จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 60 วินาที เทส่วนของของเหลวทิ้ง เติมเอทธิล อีเธอร์ 1 เท่าของแป้ง ปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วปกติเป็นเวลา 60 วินาที ทำให้แป้งแห้งด้วยการทิ้งไวใน เดสซิคเคเตอร์ 2 วัน คัดขนาดของแป้งที่ได้โดยร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 เมช

ชั่งแป้งข้าวเจ้าที่เกิดการเจลาติไนเซชันอย่างสมบูรณ์ 0,5,10, 25,50,75 และ100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองเติมแป้งข้าวเจ้าดิบเพื่อปรับน้ำหนักของแป้งเพื่อให้ครบ 100 มิลลิกรัมทุกหลอด ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 ใช้ความเข้มข้นของกลูโคอะมิเลสและเวลาในการย่อยที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 เปรียบเทียบระดับการเกิดเจลาติไนเซชันมาตรฐานกับระดับการเกิดเจลาติไนเซชันที่ได้จากการคำนวณโดยใช้สูตร

3.2.2 ประเมินภาวะที่เหมาะสมในการเกิดเจลาติไนเซชัน

เตรียมแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้นร้อยละ 30,35 และ40 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้ง ให้ความร้อน 70, 75, 80และ80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 และ90 นาทีแยกน้ำออกจากแป้ง ทำให้แป้งแห้งและคัดขนาดของแป้งเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.3 ใช้ความเข้มข้นของกลูโคอะมิเลสและเวลาในการย่อยที่ได้จากข้อ 3.2.1.1 พิจารณาระดับการเกิดเจลาติไนเซชันสูงสุดเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสม

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric factorial experiment ขนาด3x4x2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลองสองซ้ำ

3.3 หาภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยใช้เอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้คือ แอลฟา-อะมิเลส (A-3403, Sigma) และกลูโคอะมิเลส (A-7255, Sigma)

3.3.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยแอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลส

3.3.1.1 พิจารณาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยแอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลส

วิธีการทดลองแสดงดังรูป 3.3 ปิเปตสารละลายแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแป้ง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรย่อยโดยใช้แอลฟา-อะมิเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแป้ง และกลูโคอะมิเลสความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแป้ง กำหนดให้อุณหภูมิและเวลาในการย่อยสลายเป็น 30 องศาเซลเซียสและ 30 นาทีตามลำดับ ศึกษาความเป็นกรดด่าง 5 ระดับ คือ3.0,4.0,5.0,6.0 และ7.0 พิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสม

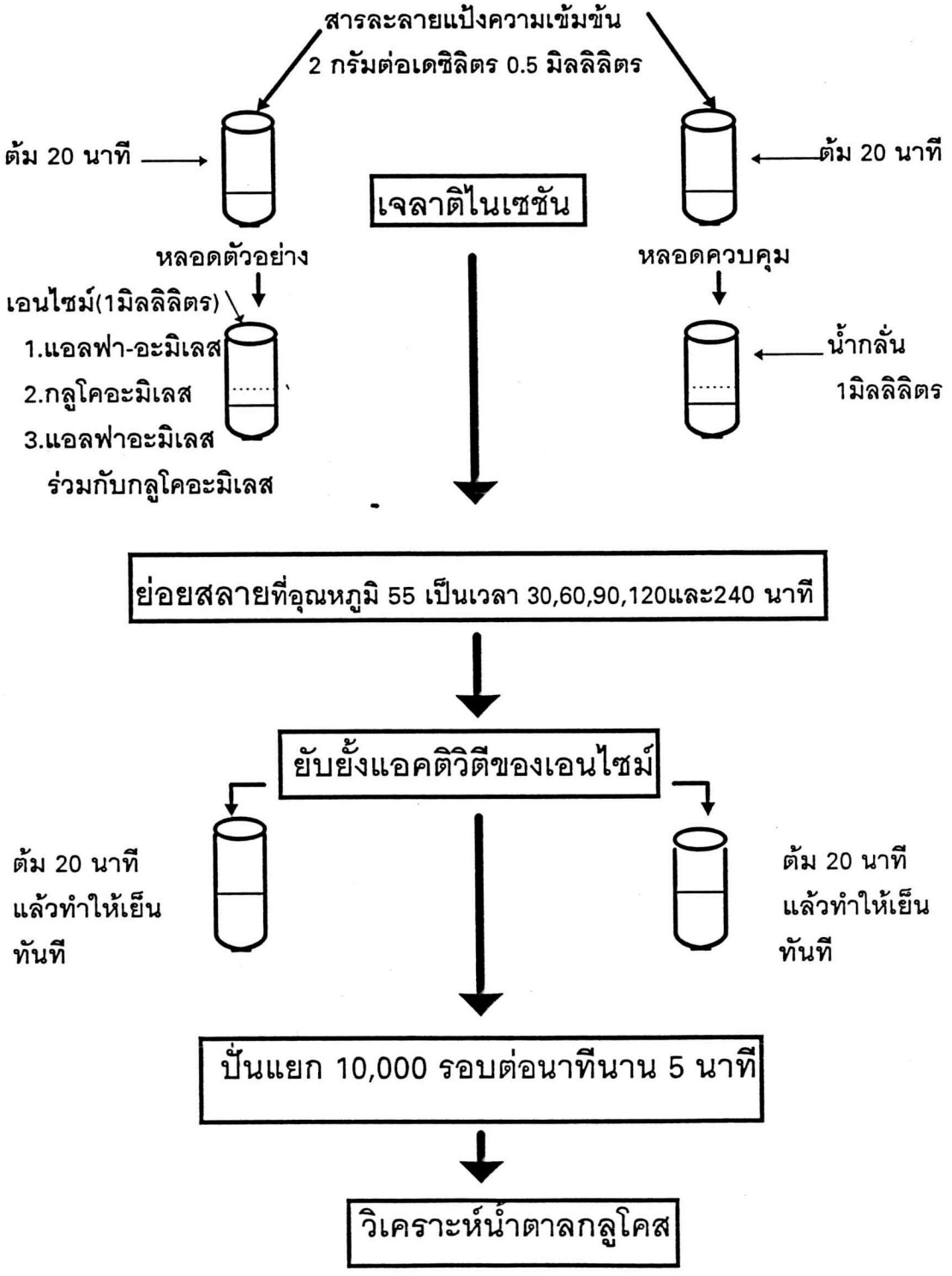
วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Complete randomized design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลองสองซ้ำ

3.3.1.2 พิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยแอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 กำหนดให้ความเป็นกรดด่างเป็น 5.0และ6.0 เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลสตามลำดับ อุณหภูมิที่ศึกษา 6 ระดับคือ 30,40,50,60,70 และ80 องศาเซลเซียส พิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสม

3.3.1 ภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยใช้แอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลสร่วมกัน

ทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1 กำหนดให้ความเข้มข้นของแอลฟา-อะมิเลสเป็นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแป้ง ความเข้มข้นของกลูโคอะมิเลสเป็นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแป้ง เวลาในการย่อยสลายเท่ากับ 30 นาที ศึกษาความเป็นกรดด่าง 4 ระดับคือ 4.5,5.0,5.5 และ6.0 และอุณหภูมิ 4 ระดับคือ 55,60,65 และ70 องศาเซลเซียส พิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสม



<u>รูปที่ 3.3</u> ขั้นตอนการศึกษาผลความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่อการย่อยแป้งข้าวเจ้าโดยแอลฟา-อะมิเลส และแอลฟา-อะมิเลสร่วมกับกลูโคอะมิเลส

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric factorial experiment ขนาดเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ทำการทดลองสองซ้ำ

3.4 เปรียบเทียบสารเสริมการผลิตสุราที่ผลิตในระบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้แอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลสร่วมกัน

ขั้นตอนการผลิตสารเสริมการผลิตสุราแสดงในรูป 3.4 นำแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักแห้งของแป้ง ให้ความร้อนเพื่อทำให้แป้งสุกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ภาวะดังกล่าวนี้ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2 ย่อยสลายแป้งข้าวเจ้าด้วยแอลฟา-อะมิเลสร่วมกับกลูโคอะมิเลส ในเครื่องปฏิกรณ์ ใช้ภาวะในการย่อยสลายที่ได้จากข้อ 3.3.2 คืออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยต้มผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยสลายแล้วในน้ำเดือดที่มีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง นำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ระเหยน้ำในเครื่องระเหยสุญญากาศ อุณหภูมิ 61 องศาเซลเซียส

ประเมินลักษณะเฉพาะของสารเสริมการผลิตสุราดังนี้ (รายละเอียดการวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ช)

3.4.1 ของแข็ง

3.4.2 ความชื้น

3.4.3 เถ้า

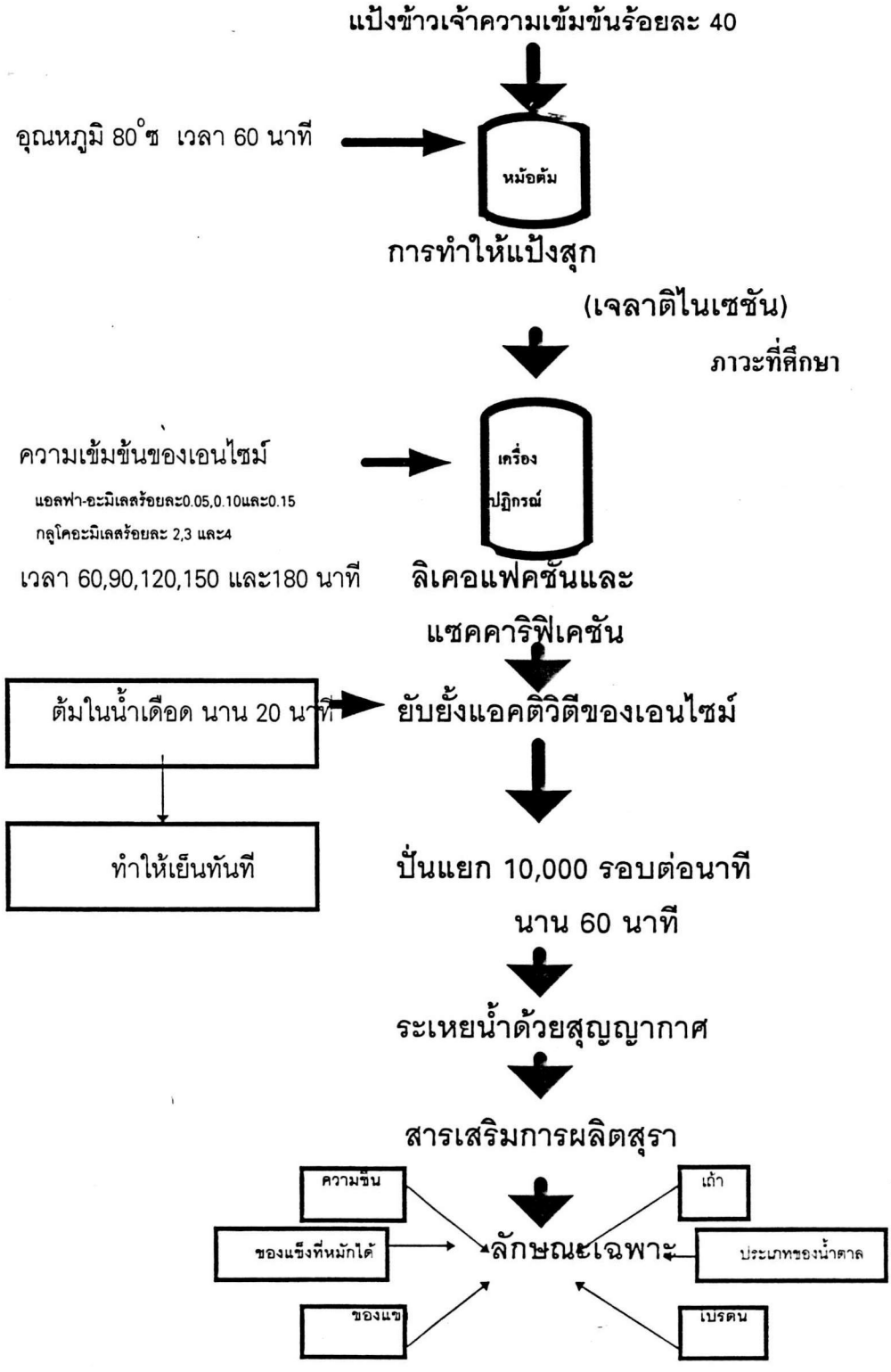
3.4.4 ของแข็งที่หมักได้

3.4.5 ค่าสมมูลย์กลูโคส (Dextrose Equivalence, DE)

3.4.6 โปรตีน

3.4.7 ประเภทของน้ำตาล

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Symmetric factorial experiment ขนาด44 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test



รูปที่ 3.4 การผลิตสารเสริมการผลิตสุราจากแป้งข้าวเจ้าโดยใช้แอลฟา-อะมิเลสและกลูโคอะมิเลสร่วมกันในการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง