บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับผลของการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยกรดเจือจางและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ของหน่อไม้ ไม้ไผ่อ่อน และไม้ไผ่แก่ ในบทนี้จะกล่าวถึง วัตถุดิบตั้งต้น สารเคมี อุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง และขั้นตอนการทดลอง แต่เนื่องจากการทดลองดังกล่าวอ้างอิงงานวิจัยของวิไลวรรณ ลีนะกุล (2009) เพื่อที่จะปรับปรุงให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่มากที่สุด โดยการออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการที่เรียกว่าการหาพื้นผิวตอบสนอง ดังนั้นขั้นตอนการทดลองรวมทั้งอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้จึงมีส่วนที่ความคล้ายคลึงกัน ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 วัตถุดิบตั้งต้นและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบตั้งต้น

หน่อไม้และไม้ไผ่พันธ์ตง ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Dendrocalamus asper Backer* จำแนกออกเป็น 3 ประเภทคือ

- หน่อไม้
- ไม้ไผ่อ่อน ความสูงน้อยกว่า 7 เมตร
- ไม้ไผ่แก่ ความสูงเกิน 7 เมตรขึ้นไป

3.1.2 สารเคมี

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
NOVO Celluclast 1.5 L	Sigma Adrich
Novozyme 188	Sigma Adrich
Citric Acid	Fluka
Tri-Sodiun citrate	Merck
Sulfuric acid 98 % (MW = 98.08 d=1.84 kg/l)	Merck

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

การปรับสภาพและการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เป็นขั้นตอนการทดลองที่ต้องใช้ความละเอียดเป็นอย่างมาก เนื่องจากปริมาณของสารตั้งต้นและสารละลายต่างๆ ส่งผลต่ออัตราการเกิดปริมาณน้ำตาลได้ทั้งสิ้น ดังนั้นในการทดลองจึงต้องใช้เครื่องมือที่มีความละเอียดและมีประสิทธิภาพที่สูง ซึ่งรายละเอียดของอุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลองมีดังนี้

3.2.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เป็นเครื่องที่ใช้สำหรับวัดปริมาณของวัตถุดิบคือหน่อไม้และไม่ไผ่ ซึ่งมีความละเอียดมากพอและเป็นที่ยอมรับในการทดลองทั่วไป โดยส่วนใหญ่แล้วนิยมนำมาวัดปริมาณสารตั้งต้นที่ต้องการในปริมาณน้อย การชั่งตัวอย่างสารตั้งต้นต้องปรับค่าให้อยู่ที่ตำแหน่งศูนย์ทุกครั้ง เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งที่ใช้ในการทดลองคือรุ่น GR-200 ยี่ห้อ AND พิกัด 260 กรัม อ่านละเอียด 0.0001 กรัม แสดงดังรูป 3.1

รูป 3.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.2 เครื่องคัดขนาดอนุภาค

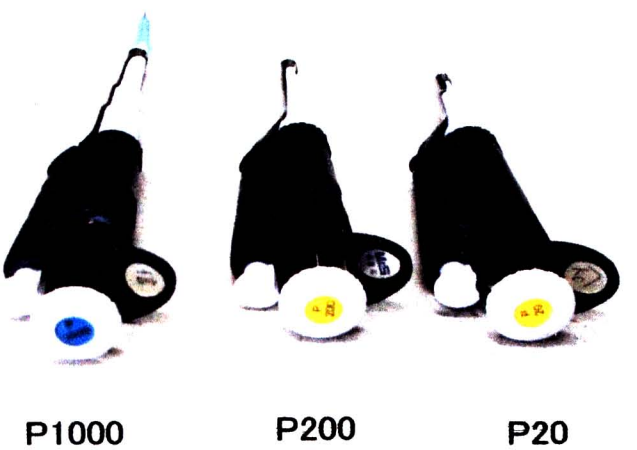
เป็นเครื่องมือแยกวัตถุดิบให้มีขนาดที่สม่ำเสมอกัน เพราะหลังจากที่ทำการบดด้วยเครื่อง Hammer mill แล้ว จะได้ขนาดของวัตถุดิบตั้งต้นที่ไม่เท่ากัน บางครั้งมีขนาดใหญ่กว่าที่ต้องการใช้ในการทดลอง ซึ่งวัตถุดิบตั้งต้นควรมีขนาดที่เท่ากันเพื่อนำพิจารณาถึงปัจจัยในการย่อยสลายเซลลูโลสในสภาวะที่เหมาะสม คุณสมบัติของเครื่องคัดขนาดอนุภาคนี้สามารถคัดอนุภาคได้เล็ก

ที่สุดคือ 180 ไมโครเมตร แต่เนื่องจากหน่อไม้และไม่ไผ่ไม่สามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาดดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงได้ขนาดของวัตถุดิบที่ศึกษาคือ 250 ไมโครเมตร

รูป 3.2 เครื่องคัดขนาดอนุภาค

3.2.3 ไมโครปิเปต

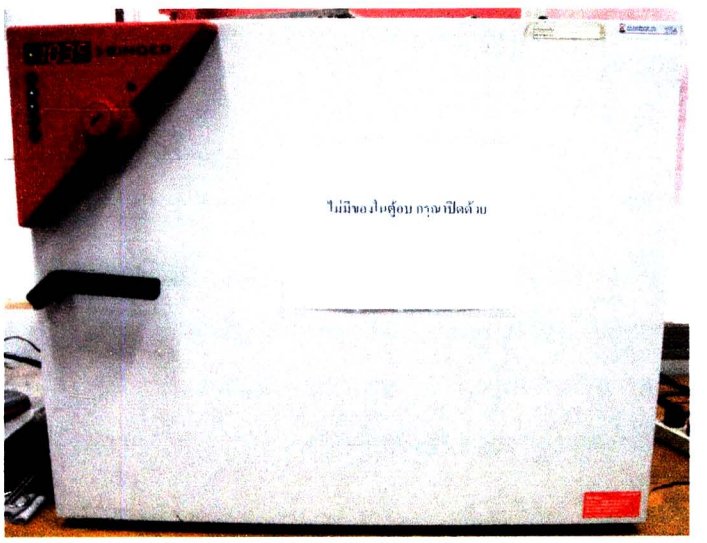
การทดลองจะใช้ปิเปตประเภท To Contain pipette **ขนาด 20-1000 ไมโครลิตร** ซึ่งถือว่ามีความแม่นยำสูงมากและมักใช้ในงานที่ต้องการปริมาณน้อยเช่นกัน การใช้ปิเปตชนิดนี้เมื่อปล่อยสารตัวอย่างลงในภาชนะที่รองรับแล้ว ต้องดูดสารละลายสำหรับเจือจาง (diluent) หรือสารละลายที่ต้องการทดลองขึ้น-ลงหลายๆ ครั้ง เพื่อชะล้างสารตัวอย่างในปิเปตต์ออกให้หมดจึงจะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง โดยจะมีขีดบอกปริมาตรอย่างชัดเจน แสดงดังรูป 3.3



รูป 3.3 ไมโครปิเปต

3.2.4 เครื่องอบลมร้อน

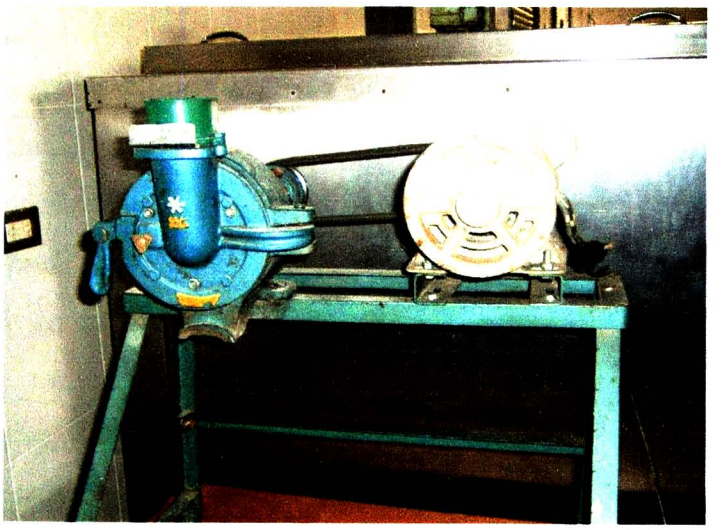
การอบแห้งหน่อไม้และไม้ไผ่ทำที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง เพื่อลดความชื้นที่จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการไฮโดรไลซิส ลักษณะของเครื่องอบลมร้อนแสดงดังรูป 3.4 หลักการทำงานคือการผลิตอากาศร้อนด้วยไอน้ำและมีพัดลมหมุนเวียนอากาศภายในเครื่องที่มีการเติมและดึงอากาศออกจากภายในตัวเครื่อง จุดที่สำคัญได้แก่การควบคุมการระบายอากาศออกจากเครื่องอบ อากาศร้อนที่ดึงออกควรมีภาวะความชื้นเหมาะสมการดึงอากาศออกโดยเร็วเกินไป ก็จะทำให้ต้องใช้พลังงานในส่วนของพัดลมและไอน้ำในการผลิตอากาศร้อนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในช่วงท้ายของการอบแห้งซึ่งการถ่ายเทความร้อนจากการพาน้อยลงสามารถลดการหมุนเวียนอากาศลงได้



รูป 3.4 เครื่องอบลมร้อน

3.2.5 เครื่องบด Hammer mill

เป็นเครื่องมือที่ทำให้วัตถุดิบตั้งต้นมีขนาดเล็กลงด้วยวิธีกล การที่วัตถุดิบถูกตัดหรือถูกทำให้แตกออกให้มีขนาดที่เล็กลง แต่จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของทางเคมีของวัตถุดิบนั้น โดยทั่วไปสิ่งที่ต้องการเมื่อทำการบด คือ ความสม่ำเสมอของขนาดหรือรูปร่างของแต่ละวัตถุดิบที่ได้จากการบด ซึ่งพิกัดการทำงานของเครื่องบดนี้สามารถทำได้ขนาด 0.2- 1.5 มิลลิเมตร แสดงดังรูป 3.5



รูป 3.5 เครื่องบด Hammer mill

3.2.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิเป็นอุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิของสารละลายให้คงที่ โดยอาศัยการเปลี่ยนรูปของพลังงานส่งผ่านตัวกลางสารละลายจากพลังงานไฟฟ้าไปเป็นพลังงานความร้อน ความต่างศักย์หรือความต้านทานของตัวทำความร้อน (heater) จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลในวงจรของอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ ทำให้เกิดการถ่ายเทพลังงานจนกระทั่งค่าความร้อน (อุณหภูมิ) เป็นไปตามค่าที่ตั้งไว้ โดยกลไกดังกล่าวควบคุมด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ แสดงดังรูป 3.6

รูป 3.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ Incubator shaker

นับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างมากสำหรับงานหลายประเภทที่ต้องการควบคุมอุณหภูมิของสภาวะการทำงาน โดยเฉพาะทางด้านจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งเป็นด้านที่มีการเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิไปใช้งานมากที่สุด อุปกรณ์ชนิดนี้ถูกใช้สำหรับการบ่มเพาะ (incubation) เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือใช้รักษาสภาพหรือขยายสาย DNA หรือ RNA ให้คงลักษณะที่ต้องการไว้

3.2.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

หม้อนึ่งความดันไอน้ำมีหลักการทำงานคือการใช้ความดันไอน้ำเข้าไปช่วยทำลายหรือเปลี่ยนแปลงสภาพวัตถุดิบตั้งต้น โดยส่วนใหญ่แล้วนิยมนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อทางด้านชีววิทยา ซึ่งจะมีพิกัดทำงานที่ความดัน 14 psi อุณหภูมิ 121-140 องศาเซลเซียส แต่ในส่วนงานวิจัยนี้จะใช้เพื่อทำการปรับสภาพวัตถุดิบคือหน่อไม้และไม้ไผ่ที่สภาวะต่างๆ กัน

การทำงานของหม้อนึ่งความดันไอน้ำจะมีลักษณะการทำงานเป็นแบบอัตโนมัติควบคุม แสดงดังรูป 3.7 สามารถปรับเลือกโปรแกรมและตั้งค่าการใช้งานได้ตามต้องการ โดยเมื่อเครื่องเริ่มทำงานไอน้ำจะไหลเข้าสู่ห้องนึ่ง อุณหภูมิและแรงดันภายในห้องนึ่งจะเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิถึงที่ตั้งเอาไว้ เครื่องก็จะเข้าสู่ขั้นตอนการ Sterilize ตามเวลาที่กำหนด เมื่อสิ้นสุดเวลา Sterilize โปรแกรมของเครื่องก็จะเข้าสู่ขั้นตอนการลดแรงดันภายในห้องนึ่งให้เท่ากับบรรยากาศภายนอกและหยุดการทำงานโดยอัตโนมัติ

รูป 3.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

3.2.8 เครื่องกรองปั้มสุญญากาศ

การกรองด้วยเครื่องกรองปั้มสุญญากาศ เป็นวิธีการกรองที่สะดวกและรวดเร็ว นิยมใช้กรวยกรองที่เรียกว่ากรวยบุชเนอร์ ซึ่งทำด้วยกระเบื้องเคลือบมีก้นแบนและมีรูพรุน มีความหนาและแข็งแรง เพราะว่าการกรองมีความรุนแรงพอสมควร หากตัวกรองไม่แข็งแรงพอจะทำให้แตกและทะลุได้ ขั้นตอนการกรองเริ่มด้วยการวางกระดาษกรองในกรวยบุชเนอร์ ซึ่งนิยมใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 whatman เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.99-11.5 มิลลิเมตร (พิจารณาตามปริมาณสารตั้งต้นที่นำมากรอง) ปิดรูพรุนทั้งหมดและทำให้เปียกด้วยการฉีดน้ำเพื่อที่จะทำให้กระดาษกรองแนบสนิทกับก้นของกรวยบุชเนอร์ สวมกรวยให้แน่นจับจุกที่อุดขวดรูปชมพู่กรอง แขนของขวดรูปชมพู่ต่อสายที่เชื่อมกับอุปกรณ์ที่เกิดสุญญากาศ แสดงดังรูป 3.8 เมื่อเปิดอุปกรณ์ที่เกิดสุญญากาศความดันระหว่างบนและด้านล่างตัวกรองจะมีความแตกต่างกัน ทำให้เกิดการกรองได้เร็วมากขึ้น

รูป 3.8 เครื่องกรองปั้มด้วยสุญญากาศ

3.2.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – เบส

เป็นเครื่องวัดความเข้มข้นของไฮโดรเนียมไอออนหรือความเป็นกรดโดยอาศัยหลักการทางเคมีซึ่งวัดโดยใช้หลอดอิเล็คโตรด

รูป 3.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – เบส

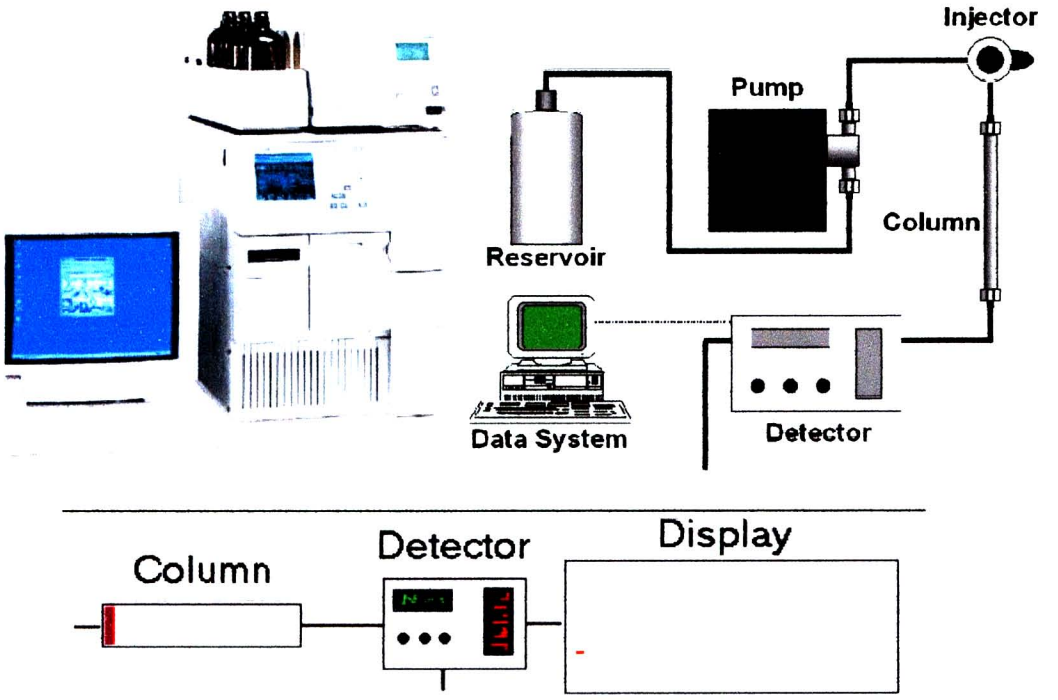
ส่วนประกอบของเครื่องวัด pH

1. ตัวเครื่อง (potentiometer) มีหน้าปัดบอกค่า pH และปุ่มต่างๆ ได้แก่ ปุ่มปรับอุณหภูมิ ปุ่มอ่านค่า ปุ่มพักเครื่อง ปุ่มปรับมาตรฐาน

2. หลอดอิเลกโทรด ประกอบด้วย glass electrode และ calomel electrode ใช้วัดแรงเคลื่อนไฟฟ้า ในการวัดจะเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแรงเคลื่อนไฟฟ้าในอิเล็คโตรดทั้งสองชนิด

3.2.10 เครื่องวัดปริมาณองค์ประกอบของน้ำตาล (HPLC)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เป็นเทคนิคแยกสารที่อาศัยปั๊มที่มีแรงดันสูง (high pressure pump) ดูดตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) นำสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร ผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่แตกต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ ตรวจวัดพบ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์และแปลผลต่อไป



รูป 3.10 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

การแยกและวิเคราะห์สารโดย HPLC จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการพิจารณาเลือกใช้ทั้งปริมาณ Sample, Detector, Column และ Solvent Mobile Phase ให้เหมาะกับชนิดของสารนั้นๆ เนื่องจากว่าคุณสมบัติดังกล่าวจะทำให้ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลได้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น หากเลือกเงื่อนไขอื่นที่ไม่ตรงกันจะมีผลทำให้ค่าที่ได้ Error มากเกินความเป็นจริง

3.3 ขั้นตอนการทดลองงานวิจัย

3.3.1 ตัดวัตถุดิบไม้ไผ่ให้มีขนาดเล็กลง 5-7 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำไปลดความชื้นด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียสและที่เวลา 72 ชั่วโมง (AOAC, 1995)

3.3.2 นำวัตถุดิบหน่อไม้และไม้ไผ่บดด้วยเครื่อง Hammer mill ให้มีขนาดเล็กที่สุด จากนั้นนำมาร่อนเพื่อแยกขนาดด้วยเครื่องคัดอนุภาคขนาด 0.25 มิลลิเมตร ใส่ในถุงที่ปิดอย่างดีจนกว่าจะถูกนำไปใช้ในการทดลอง

3.3.3 ทำการปรับสภาพวัตถุดิบหน่อไม้และไม้ไผ่โดยมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10 % น้ำหนักต่อปริมาตรคือวัตถุดิบตั้งต้น 5 กรัมต่อสารละลาย 50 มิลลิลิตร ปรับสภาพด้วยการผสมกรดซัลฟิวริกเจือจางและนำไปทดลองในหม้อนึ่งความดันที่สภาวะต่างๆ ซึ่งการทดลองจะเริ่มจาก

อุณหภูมิห้องเป็นต้นไป เมื่อถึงอุณหภูมิที่ต้องการ เริ่มนับเวลาตามที่กำหนดไว้ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งต่อการทดลอง เพื่อทดสอบความคาดเคลื่อนของการทดลอง โดยมีสภาวะการปรับสภาพวัตถุดิบดังนี้

- กำหนดอุณหภูมิคงที่ 140 องศาเซลเซียส
- ความเข้มข้นของกรดที่ใช้เท่ากับ 0.4, 0.6, 1.0, 1.4, 1.6 % w/w
- เวลาที่ใช้เท่ากับ 45, 60, 90,120,135 นาที

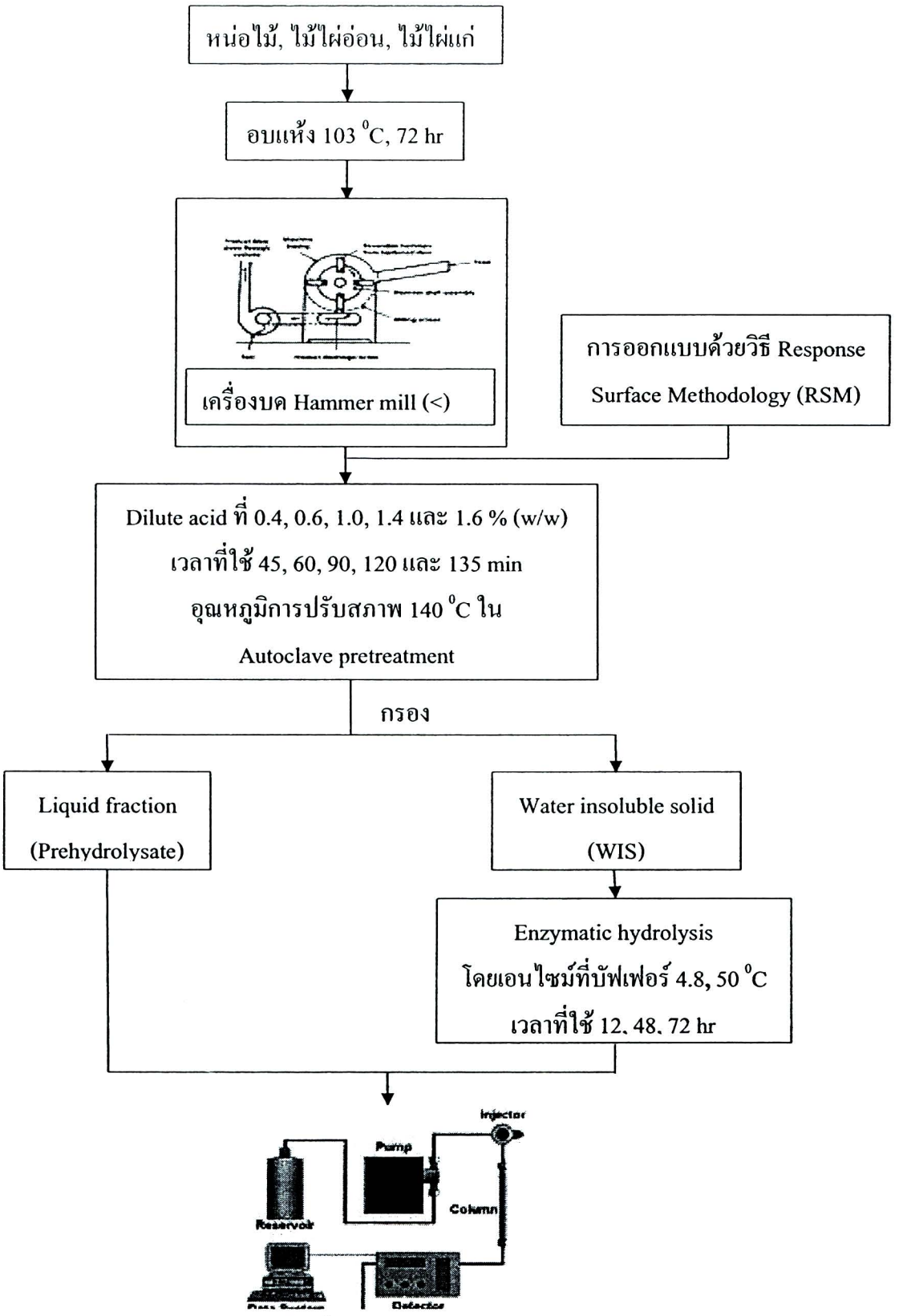
3.3.4 เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำวัตถุดิบหน่อไม้และไม้ไผ่ออกจากหม้อนึ่งความดัน ทิ้งไว้สักพักรอจนกระทั่งอุณหภูมิถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส จึงทำการกรองส่วนที่เป็นเป็นของแข็งและของเหลวออกจากกัน

3.3.5 ของเหลว (prehydrolysate) นำมาทำการวัดปริมาณน้ำตาลโมเลกุลคือน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลด้วยการใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

3.3.6 ของแข็ง (water insoluble solid หรือ WIS) นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าความเป็นกลางที่ pH 4.8 และหลังจากนั้นปิดปากถุงให้สนิทและนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ต่อไป

3.3.7 ทำการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ส่วนที่เป็นของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ (WIS) โดยมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 5 % น้ำหนักต่อปริมาตรคือวัตถุดิบตั้งต้น 5 กรัมต่อสารละลาย 25 มิลลิลิตร เอนไซม์ที่ใช้คือเอนไซม์เซลลูเลสและ β-glucosidase ซึ่งเอนไซม์ β-glucosidase ใช้เพื่อเป็นส่วนเติมต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส โดยที่จะใช้เอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 15 Filter Paper Unit ต่อกรัมสารตั้งต้น และ15 International Unit ต่อกรัมสารตั้งต้น ตามลำดับ นำส่วนประกอบทั้งหมดใส่ในขวด Erlenmayer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร โดยส่วนประกอบทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จะถูกทำใน 0.05 โมลาร์ของสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้นกรดเบสเท่ากับ 4.8 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 48 และ 72 ชั่วโมง ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking incubator) ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที

3.3.8 เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแบ่งสารละลายมาจำนวนเล็กน้อยเพื่อทำการวิเคราะห์น้ำตาลองค์ประกอบที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC



รูป 3.11 ขั้นตอนการทดลองงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง

จากการศึกษาการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางของไม้ไผ่ (วิไลวรรณ, 2552) พบว่าปริมาณน้ำตาลที่มากที่สุดคือสภาวะความเข้มกรด 1.0 %w/w เวลาในการปรับสภาพ 90 นาที และอุณหภูมิระหว่าง 120 และ 140 องศาเซลเซียส พบว่า 140 นาทีได้ปริมาณน้ำตาลมากกว่า จึงกำหนดอุณหภูมิในการปรับสภาพคงที่ 140 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงทำให้มีตัวแปรที่ศึกษาคือ 2 ตัวแปรได้แก่ ความเข้มข้นกรดและเวลาในการปรับสภาพ และงานวิจัยนี้ศึกษาวัตถุดิบ 3 ชนิด คือ หน่อไม้ ไม้ไผ่อ่อน และไม้ไผ่แก่ จึงทำให้ตัวอย่างที่ศึกษามีจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคการออกแบบทางวิศวกรรมมาช่วยในการวางแผนการทดลองเพื่อหาสภาวะในการย่อยสลายน้ำตาลให้ได้ผลมากที่สุด และเป็นการลดจำนวนตัวอย่างการศึกษาอีกด้วย ซึ่งการวางแผนการทดลองดังกล่าวเรียกว่า วิธีพื้นผิวผลตอบสนอง หรือเรียกสั้นว่า RSM มีขั้นตอนการออกแบบโดยทั่วไปดังนี้

3.5.1. กำหนดแผนการทดลองที่จะใช้และการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่างที่เหมาะสม ที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้าง Contour plot โดยกำหนด Factor หรือปัจจัยที่สำคัญ 2 หรือ 3 ปัจจัย กำหนดระดับปัจจัยที่จะศึกษา

3.5.2 เก็บรวบรวมข้อมูลและนำข้อมูลที่ได้มาสร้างสมการ regression ที่ดีที่สุด (SAS , SPSS)

3.5.3 สร้าง Contour plot จากสมการที่หามาได้ (ใช้ Program sufer , statistica หรือ Sigma plot)

3.5.4 ตรวจสอบ Model

3.5.5 Verification โดยการทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว และตรวจหา Optimization

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการออกแบบพื้นผิวตอบสนองที่เรียกว่า การออกแบบส่วนประสมกลาง หรือเรียกสั้นว่า CCD โดยใช้โปรแกรม Minitab เวอร์ชั่น V14 ซึ่งกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาดังตาราง 3.1 ทำให้ได้การทดลองทั้งหมด 12 การทดลองต่อ 1 ชุดการทดลอง ประกอบด้วย จุดกึ่งกลาง (center point) จำนวน 4 การทดลอง จุดขอบ (axial point) จำนวน 4 การทดลอง และ factorial point จำนวน 4 การทดลอง เนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านพบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือความเข้มข้นกรด 1.0 %w/w และเวลาในการปรับสภาพ 90 นาที ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวเป็นจุดกึ่งกลาง รายละเอียดขั้นตอนการออกแบบ CCD มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 กำหนดฟังก์ชันของตัวแปรที่ศึกษาคือความเข้มข้นกรดและเวลาในการปรับสภาพ คือ

y= f(ความเข้มข้นกรด, เวลา)

$y = f(x_c, x_t)$

ขั้นตอนที่ 2 กำหนดปัจจัย ระดับขอบเขต และสัญลักษณ์เพื่อหาค่าที่เหมาะสม

กำหนดค่า α = +1.5 , -1.5 ดังนั้นปัจจัยมี 5 ระดับคือ -1.5, 1.0, 0, +1.0, +1.5

ตาราง 3.1 ปัจจัยที่มีผลของการออกแบบ CCD

ปัจจัย	ระดับ					สัญลักษณ์
	-1.5	-1	0	+1	+1.5	
ความเข้มข้นของกรด	0.4	0.6	1	1.4	1.6	x_c
เวลา	45	60	90	120	135	x_t

ตาราง 3.2 ค่าต่ำ-สูงและหน่วยของปัจจัย

Setting	Low (-1)	High (+1)	หน่วย
x_c	0.6	1.4	%w/w
x_t	60	120	นาที

จุดกึ่งกลาง (Center Point) คือ 1.0 %w/w และ 90 min การทดลองนี้ทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง (Center Point) จำนวน 4 การทดลอง จึงมีจำนวนการทดลอง 12 การทดลองต่อชุดการทดลอง และทดสอบ 3 ครั้ง จำนวนการทดลองทั้งหมด 36 การทดลอง ยกตัวอย่างชุดการทดลองของหน่อไม้แสดงดังตางราง 3.3

ตาราง 3.3 การออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD ของหน่อไม้

Run	X_t (min)	X_C (%w/w)	X_1	X_2	Y (%)
1	60	0.6	-1	-1	27.52
2	120	0.6	1	-1	29.33
3	60	1.4	-1	1	27.53
4	120	1.4	1	1	31.51
5	45	1	-1.5	0	26.25
6	135	1	1.5	0	34.50
7	90	0.4	0	-1.5	24.63
8	90	1.6	0	1.5	27.30

ตาราง 3.3 แสดงการออกแบบการทดลองด้วยวิธี CCD หน่อไม้ (ต่อ)

Run	X_t (min)	X_C (%w/w)	X_1	X_2	Y (%)
9	90	1	0	0	31.14
10	90	1	0	0	29.91
11	90	1	0	0	31.50
12	90	1	0	0	30.90

ขั้นตอนที่ 3 นำผลการทดลองที่ได้เข้าสมการ regression เพื่อหาสมการที่ดีที่สุด

การวิเคราะห์รีเกรสชันความสัมพันธ์อันดับสอง ทำการป้อนข้อมูล โดยสร้างตัวแปรให้ครบตามจำนวนและป้อนข้อมูลในแนวคอลัมน์ ส่วนระดับของตัวแปร ใช้รหัส (Code) ที่กำหนดไว้ ในการวิเคราะห์ให้เลือกเมนู Statistics \ Linear Models \ Linear Regression และเลือกตัวแปรตามและอิสระ รวมทั้งการคำนวณค่าคงที่ แสดงดังตาราง 3.4 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์เป็นดังนี้

ตาราง 3.4 ค่าประมาณค่าพารามิเตอร์ของการวิเคราะห์การถดถอย

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	235.913	235.913	47.183	20.25	0.000
Linear	2	129.932	129.932	64.966	27.88	0.000
Square	2	102.482	102.482	51.241	21.99	0.000
Interaction	1	3.499	3.499	3.499	1.50	0.230
Residual Error	30	69.916	69.916	2.331		
Lack-of-Fit	3	13.215	13.215	4.405	2.10	0.124
Pure Error	27	56.702	56.702	2.100		
Total	35	305.829				

จากตาราง 3.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน แสดงค่าต่างๆที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน ดังนี้

ตรวจสอบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของสมการมีค่าเป็นศูนย์หรือไม่

H_0 : All $\beta_i = 0$

H_1 : At least one $\beta_i \neq 0$

ได้ค่าสิติ F = 20.25 และ p = 0.000 < 0.05 นั่นคือค่าสัมประสิทธิ์ทุกตัวไม่เท่ากับศูนย์

ตรวจสอบว่าตัวแบบที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูล (lack of fit) หรือไม่

H_0 : ตัวแบบมีความเหมาะสมกับข้อมูล

H_1 : ตัวแบบไม่เหมาะสมกับข้อมูล

ได้ค่าสถิติ F = 2.10 และค่า p = 0.124 > 0.05 สามารถกล่าวได้ว่าตัวแบบที่ได้มีความเหมาะสม ดังนั้นสมการพยากรณ์ที่ได้คือ

$$\hat{y} = 30.8936 + 2.1367x_1 + 0.7280x_2 + 0.54x_1x_2 - 0.1215x_1^2 - 2.08x_2^2$$

ขั้นตอนที่ 4 นำค่าที่ได้จากสมการไป plot graph โดยใช้ Program SAS, statistica หรือ Sigma plot