บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การจัดการและการใช้ประโยชน์ของวัสดุเหลือทิ้งในกระบวนการแปรรูปมะพร้าวขาว ดำเนินการร่วมกับผู้ประกอบการแปรรูปมะพร้าวขาวระดับชุมชน และระดับอุตสาหกรรม ในพื้นที่ตำบลทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน มีวิธีการดำเนินการวิจัย ดังนี้

3.1 การใช้เทคโนโลยีสะอาดในกระบวนการแปรรูปมะพร้าวขาว

วิธีดำเนินการตรวจประเมินเทคโนโลยีสะอาดในกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว [สถาบันสิ่งแวดล้อมอุตสาหกรรม, 2541] ประกอบด้วย

3.1.1 การตรวจประเมินเบื้องต้น (Pre assessment)

วัตถุประสงค์ เพื่อเลือกหัวข้อเน้นในขั้นตอนการตรวจประเมินละเอียด ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

3.1.1.1 การจัดทำแผนภาพกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว ประกอบด้วย

- การสำรวจโรงงานผลิตมะพร้าวขาว โดยการเดินสำรวจ การสอบถาม และจดบันทึก เพื่อรวบรวมข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ สถานที่ตั้ง กำลังการผลิต ชนิดและปริมาณวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ และมาตรฐานมะพร้าวขาว เป็นต้น
- การจัดทำแผนภาพกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว ข้อมูลการใช้ทรัพยากร และการเกิดของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว

3.1.1.2 วัตถุดิบที่ป้อนเข้าและสารออกทั้งหมด ประกอบด้วย วัตถุดิบที่ป้อนเข้า ผลิตภัณฑ์ ผลพลอยได้ การใช้พลังงานและทรัพยากร และการเกิดของเหลือทิ้งออกจากกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว

3.1.1.3 การเลือกหัวข้อเน้นสำหรับการตรวจประเมินละเอียด เป็นการกำหนดรายละเอียดของเป้าหมาย CT ในกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว ผลจากการตรวจประเมินจะถูกนำมาใช้ในการเลือกหัวข้อเน้นสำหรับการตรวจประเมินละเอียดต่อไป โดยการเลือกหัวข้อเน้นจะพิจารณาจาก ประสิทธิภาพการผลิตเบื้องต้นทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ปริมาณของเหลือทิ้งออกจากระบบ ปริมาณการใช้พลังงานและทรัพยากร และค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้น เป็นต้น

3.1.2 การตรวจประเมินละเอียด (Detail assessment)

วัตถุประสงค์ เพื่อสร้างชุดข้อเสนอเทคโนโลยีสะอาด (CT-options) พร้อมกำหนดข้อเสนอที่ปฏิบัติได้ทันทีและข้อเสนอที่ต้องศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมอีก ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ

3.1.2.1 การจัดทำดุลมวลสาร เพื่อให้ทราบปริมาณสารเข้าและออก รวมถึงราคาที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบและของเหลือทิ้ง ค่าใช้จ่ายของพลังงานในผลิตภัณฑ์และของเหลือทิ้ง เป็นต้น จากนั้น การทำดุลมวลสารจะช่วยวัดผลการปรับปรุงทั้งการลดปริมาณของเหลือทิ้งและค่าใช้จ่าย หลังการใช้ข้อเสนอ CT

3.1.2.2 การตรวจประเมินหาสาเหตุ เพื่อหาแหล่งกำเนิดและสาเหตุของการสูญเสีย พิจารณาจาก 5 แหล่ง ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตมะพร้าวขาว ได้แก่ วัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ของเหลือทิ้ง วิธีการทำงาน และเทคโนโลยี โดยอาศัยข้อมูลจากการทำดุลมวลสารนำมาช่วยในการวิเคราะห์หาสาเหตุ และนำไปสู่แนวทางการแก้ไขสำหรับสร้างข้อเสนอ CT ต่อไป

3.1.2.3 การสร้างข้อเสนอเทคโนโลยีสะอาด (CT-options) การนำข้อมูลจากดุลมวลสารและการทราบแหล่งกำเนิด/สาเหตุของการเกิดของเหลือทิ้ง เข้าสู่ขั้นตอนการสร้างข้อเสนอ CT เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ลดการสูญเสียของผลผลิต และลดการปลดปล่อยของเหลือทิ้ง โดยการระดมความคิดเห็นจากคณะผู้วิจัย

3.1.2.4 การคัดเลือกข้อเสนอ CT เป็นการจัดกลุ่มและเรียงลำดับข้อเสนอ CT เพื่อช่วยในการคัดเลือกข้อเสนอสำหรับนำไปใช้ โดยมีหลักการพิจารณา 3 ประการ ได้แก่ ความเป็นไปได้ทางเทคนิคหรือความเหมาะสมในการนำไปปฏิบัติ ความเป็นไปได้เชิงเศรษฐศาสตร์ และความเหมาะสมด้านสิ่งแวดล้อม

3.1.3 การนำข้อเสนอ CT สู่ผู้ประกอบการ โดยการนำข้อเสนอ CT ถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการเพื่อนำไปปฏิบัติ

3.2 การพัฒนาการผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าว วิธีการดำเนินงานวิจัย ประกอบด้วย

3.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา

น้ำมะพร้าวแก่รวบรวมจากโรงงานผลิตมะพร้าวขาว ในเขตบางมด จังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.2.2 การเตรียมวัตถุดิบ

การเตรียมน้ำมะพร้าวแก่เพื่อใช้ในการผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่เริ่มจากการนำน้ำมะพร้าวแก่ที่ผ่านการเติมน้ำตาลซูโครส 5% ไปผ่านการฆ่าเชื้อที่ความดัน 2000 psi อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมะพร้าวแก่

นำน้ำมะพร้าวแก่มาศึกษาสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รส ทางด้านเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) ที่วัดในรูปกรดแลคติก ค่าความหวาน (Brix) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

3.2.4 การศึกษาผลของชนิดหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่อระยะเวลาในการหมักและคุณภาพของเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

3.2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก

หัวเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ได้แก่ หัวเชื้อจากนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม (*Lactobacillus casei*) และหัวเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR No. 450, *Lactobacillus casei* TISTR No. 390, *Lactobacillus delbrueckii* TISTR No. 326 จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย การเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 3 ชนิดในอาหารเหลว MRS (Himedia Laboratories. PVT. LTD) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4.2 การผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 ชุดทดลอง คือชุดทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยใช้หัวเชื้อจากนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม และหัวเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus delbrueckii* ตามลำดับ กระบวนการผลิตเริ่มจากการเติมหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิดปริมาณ 5% ลงในน้ำมะพร้าวแก่ที่เตรียมในข้อ 3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและชีวภาพดังนี้คือวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรดที่วัดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

สำหรับการศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่นั้น ดำเนินการทดลองโดยการนำน้ำมะพร้าวแก่ที่เติมหัวเชื้อทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวข้างต้นมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เหลือรอดในน้ำมะพร้าวแก่ด้วยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

3.2.5 การศึกษาผลของวิธีการเตรียมหัวเชื้อต่อคุณภาพของเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

3.2.5.1 การเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติก

การเตรียมหัวเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ *L. acidophilus* และ *L. casei* ในอาหารเหลว MRS (Himedia Laboratories. PVT. LTD) บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วง log phase จากนั้นนำไป

ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเท อาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำมะพร้าวแก่ ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง

3.2.5.2 การผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากน้ำมะพร้าวแก่

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุดทดลอง คือชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ใช้หัวเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. casei* ตามลำดับ กระบวนการผลิตเริ่มจากการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 ลงในน้ำมะพร้าวแก่ที่เตรียมในข้อ 3.2 โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้นประมาณ 7 log cfu/mL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและชีวภาพดังนี้คือ วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรดที่วัดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count

3.2.6 วิธีวิเคราะห์

ตรวจวัดปริมาณความชื้น (% MC) ด้วยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ปริมาณเถ้าทั้งหมด (% Ash) ด้วยการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. (AOAC, 1995) คำนวณหาปริมาณคาร์บอนทั้งหมด (% TC) ตามสมการของ Navarro และคณะ (1993) วัดค่า pH ของตัวอย่างด้วย pH meter [AOAC, 1995] ค่าความเป็นกรดในรูปกรดแลคติก (as %lactic acid) ด้วยการไทเทรตกับ 0.1 N NaoH และใช้ phenophthalien เป็นอินดิเคเตอร์ [AOAC, 1995] วัดค่าความหวาน ($^{\circ}$Brix)ด้วย Refractometer [AOAC, 1995] ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี phenol-sulfuric acid [Dubios et al., 1956] ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีนทั้งหมด โดยวิธี Macro Kjeldahl [AOAC, 1995] และนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count บนอาหารแข็ง MRS หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง [Johnson and Case, 1989]

3.2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำและรายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวน (mean ± SD) วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการใช้โปรแกรม minitab version 14 (Minitab Inc., United States).เพื่อวิเคราะห์ ANOVA และ least significant digit (LSD) เพื่อดูความแตกต่างของพารามิเตอร์ในแต่ละชุดทดลอง

3.3 การทำปุ๋ยน้ำสกัด (Compost tea) จากปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว

3.3.1 การเตรียมปุ๋ยหมักจากขุยมะพร้าว

การศึกษาส่วนนี้ได้ทำการผลิตปุ๋ยหมักแบบกองจากขุยมะพร้าว โดยใช้อัตราส่วนของวัสดุหมักจากสูตรที่เหมาะสมที่สุดในการทำปุ๋ยหมักจากขุยมะพร้าว ซึ่งได้แก่ ขุยมะพร้าว มูลวัว รำ และกากน้ำตาล อัตราส่วนเท่ากับ 3:1:1:0.1 (โดยน้ำหนัก) และใช้น้ำมะพร้าวเป็นตัวเพิ่มสารอาหารและปรับความชื้นให้แก่

กองปุ๋ย โดยควบคุมความชื้นเริ่มต้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 60 และหมักทิ้งไว้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 เดือน [ทรงพล คูณศรีสุข และคณะ, 2552] นำปุ๋ยหมักที่ได้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำปุ๋ยน้ำสกัด จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพของปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว

3.3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว

ตรวจวัดคุณภาพของปุ๋ยหมักจากขุยมะพร้าวที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.1 ดังต่อไปนี้

ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ด้วยวิธี Macro Kjeldahl method [AOAC, 1995] ปริมาณฟอสฟอรัส โดยใช้วิธี Ascorbic Acid Method ประยุกต์จากวิธีของ Kuo (1996) ปริมาณโพแทสเซียมโดยใช้วิธี Atomic Absorption Spectrophotometer [AOAC, 1995]

3.3.3 การศึกษาผลของการเติมกากน้ำตาลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของปุ๋ยน้ำสกัด (Compost teas)

การศึกษาส่วนนี้จะทำการประเมินศักยภาพของการใช้ปุ๋ยหมักจากขุยมะพร้าวเป็นวัตถุดิบในกระบวนการทำปุ๋ยน้ำสกัด (Compost tea) วัตถุดิบที่ใช้ ได้แก่ ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าวและน้ำ ในอัตราส่วน 1:10 [อุทัย คันโธ และ สุกัญญา จัตตุพรพงษ์, 2552] และมีการเติมสารอาหารแก่จุลินทรีย์ ได้แก่ กากน้ำตาลร้อยละ 10 ในระหว่างกระบวนการทำปุ๋ยน้ำสกัด โดยใช้ระยะเวลาหมักอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ชุดทดลองที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย (1) ปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว (ชุดควบคุม) (2) ปุ๋ยน้ำสกัดปุ๋ยหมักขุยมะพร้าว (ไม่เติมกากน้ำตาล) (3) ปุ๋ยน้ำสกัดปุ๋ยหมักขุยมะพร้าวที่เติมกากน้ำตาล 10% ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างน้ำสกัดที่เวลาเริ่มต้น, 6, 12, 24, 28, 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจคุณภาพปุ๋ยน้ำสกัด ความเป็นพิษต่อพืช ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

3.3.3.1 ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของปุ๋ยน้ำสกัด (Compost tea) ดังต่อไปนี้

สมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ด้วย pH meter รุ่น Consort C830 ค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง EC Conductivity meter รุ่น 4310 ยี่ห้อ JENWAY ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ด้วยวิธี Macro Kjeldahl method [AOAC, 1995] ปริมาณฟอสฟอรัส โดยใช้วิธี Ascorbic Acid Method ประยุกต์จากวิธีของ Kuo (1996) ปริมาณโพแทสเซียมโดยใช้วิธี Atomic Absorption Spectrophotometer [AOAC, 1995] ปริมาณกรดอินทรีย์ โดยใช้ FID Gas Chromatrography รุ่น GC-143 ยี่ห้อ SHIMAZU

ปริมาณจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Plate count [Johnson and Case, 1989]

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3.3.2 ความเป็นพิษต่อพืช (Phytotoxicity test)

โดยใช้เทคนิค Seed germination test [ISTA, 1993] ซึ่งเมล็ดพืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เมล็ดกะหล่ำ (Chinese cabbage : *Brassica pekinensis*) พิจารณาความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในรูปของค่า %Relative seed germination %Relative root growth และ Germination index (GI) [ISTA, 1993]

3.3.3.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

ศึกษาประสิทธิภาพของปุ๋ยน้ำสกัดในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ/พืชอาหาร เช่น ผัก และผลไม้ต่างๆ ซึ่งประสบปัญหาจากโรคพืชหลายชนิด เช่น โรคราสนิม โรคราน้ำค้าง โรคกล้าเน่า โรคใบไหม้ และ โรคแอนแทรกโนส เป็นต้น ซึ่งโรคดังกล่าวมีสาเหตุมาจากเชื้อราหลายชนิด ในการศึกษานี้เลือกใช้ *Collectotrichum capsici* และ *Collectotrichum gloeosporioides* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยน้ำสกัด โดยใช้เทคนิค Agar Well Diffusion Assay (AWDA) [Parente et al., 1995] วัดประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar