

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย เรื่อง “การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาสองขั้นตอนจากกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้เอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยว” ประกอบด้วยขั้นตอนการดำเนินการต่างๆ ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาองค์ประกอบของกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า และการกระจายขนาดอนุภาคของกากกะทิ

ขั้นตอนที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดด้วยเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวสูตร LM-pH5

ขั้นตอนที่ 3 การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานด้วยเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม

ขั้นตอนที่ 4 การผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 จากตลาด

ขั้นตอนที่ 5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ในขั้นตอนเดียวจากกากกะทิจากตลาดด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล

ขั้นตอนที่ 6 กระบวนการหมักกึ่งเหลวแบบ Fed-batch เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะทิจากตลาดด้วยผงเอนไซม์ผสม CCN-RT-P3

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตผงเอนไซม์ผสมคือของเหลือจากกะทิที่ถูกคั้นน้ำกะทิออกแล้ว เรียกว่า กากกะทิ หรือ coconut residue (CCNR) ที่มาของวัตถุดิบมาจาก 2 แหล่ง คือแหล่งที่ 1 ให้ชื่อกากกะทิเป็น CCNR-M ความชื้นเริ่มต้นประมาณร้อยละ 78-80 โดยน้ำหนัก จากตลาดการเคหะ คลองหก ธิญบุรี จ. ปทุมธานี ราคา 2 บาท ต่อกิโลกรัม น้ำหนักเปียก ถูกทำให้แห้งโดยการตากแดด ดังรูปที่ 3.1 เมื่อผ่านการตากแดดเป็นเวลา 3 วัน ความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก และเก็บไว้ในถังพลาสติกที่มีฝาปิดที่อุณหภูมิห้อง วัตถุดิบแหล่งที่ 2 คือกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานหรือ CCNR-F ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแนชเจอร์ลมายด์ จำกัด จังหวัดชุมพร เป็นของเหลือจากการผลิตน้ำมันมะพร้าวโดยการสกัดเย็น

การกระจายขนาดอนุภาคหาได้จากเครื่องคัดขนาด ยี่ห้อ Endecotts รุ่น ASTM E11 ดังรูปที่ 3.2

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบกากกะทิแห้งเซลลูโลสด้วยวิธีมาตรฐาน TAPPI 203 om – 88 [49] แก้วด้วยวิธีมาตรฐาน TAPPI 203 om – 85 ความชื้นด้วยวิธีมาตรฐาน TAPPI 203 om – 86 และลิกนินด้วยวิธีมาตรฐาน TAPPI 222 om-88. 1988 [50]



รูปที่ 3.1 กากกะทิจากตลาดชุมชนเคหะรังสิตถูกนำตากแดดเพื่อไล่ความชื้น



รูปที่ 3.2 เครื่องหาการกระจายขนาดอนุภาคกากกะทิโดยใช้ตะแกรงมาตรฐาน

3.3 การเตรียมจุลินทรีย์ผสม

เชื้อเดี่ยว หมายถึง จุลินทรีย์บริสุทธิ์หนึ่งสายพันธุ์ นำมาปลูกถ่ายหรือเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งที่เหมาะสม คือ ไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT-P1 (*Trichoderma reesei* RT-P1) และแซคคาโรมายซีส ซีรีวิซีอี RIT-P2 (*Saccharomyces cerevisiae* RT-P2) แต่ละสายพันธุ์เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (PDA) และวยายเอ็มเอ (YMA) ตามลำดับ

วิธีการปลูกถ่ายเชื้อเดี่ยวขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น

3.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT01

ไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT-P1 เป็นเชื้อรา ลักษณะภายนอกที่มองเห็นด้วยตาเปล่ามีสีเขียวบนอาหารเต็มพื้นที่ ปลูกถ่ายไว้ในหลอดวุ้นเอียง นำมาเพาะเลี้ยงต่อบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ ดังรูปที่ 3.3 ซึ่งมีวิธีการดังนี้

การเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอตามสูตร คือ ละลาย potato dextrose agar ปริมาณ 39 กรัม ในน้ำอาร์โอปริมาตร 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 120 °C และความดัน 14.7 psig หลังจากนั้นนำมาเทลงบนจานเพาะเชื้อในตู้เชื้อจะได้อาหารวุ้นแข็ง นำเข็มเย็บเชื้อปลายแหลมมาเขี่ยไตรโคเดอร์มา รีสีอี จากหลอดวุ้นเอียง ไปวางบนอาหารวุ้นแข็งตรงบริเวณศูนย์กลางของจาน ปิดฝาจานแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีความชื้น ไตรโคเดอร์มา รีสีอีจะเติบโตเต็มที่เป็นสีเขียวบนอาหารวุ้นแข็ง ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน

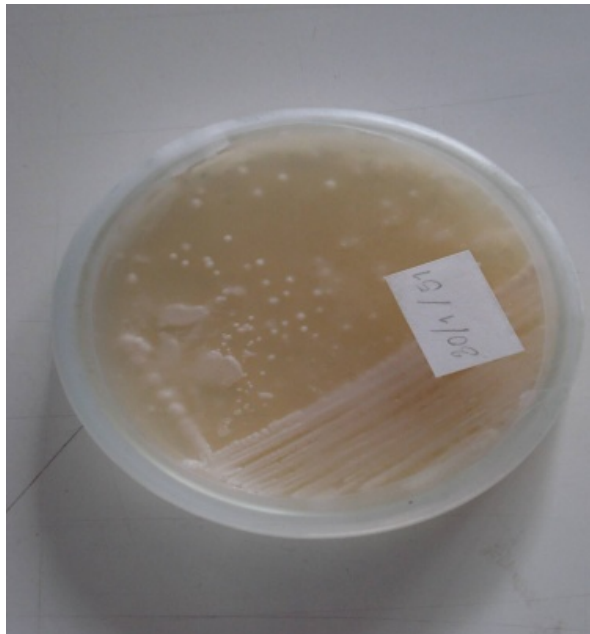


รูปที่ 3.3 ไตรโคเดอร์มา รีสีอี RT-P1 เติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอ

3.3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงแซคคาโรมายซิส ซีรีวิซี RT-P2

แซคคาโรมายซิส ซีรีวิซี RT-P2 มีลักษณะภายนอกที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นเม็ดสีขาว กระจายเป็นโคโลนีเดี่ยว อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์คืออาหารวุ้นแข็งวายเป็นเอมเอ ดังรูปที่ 3.4 ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

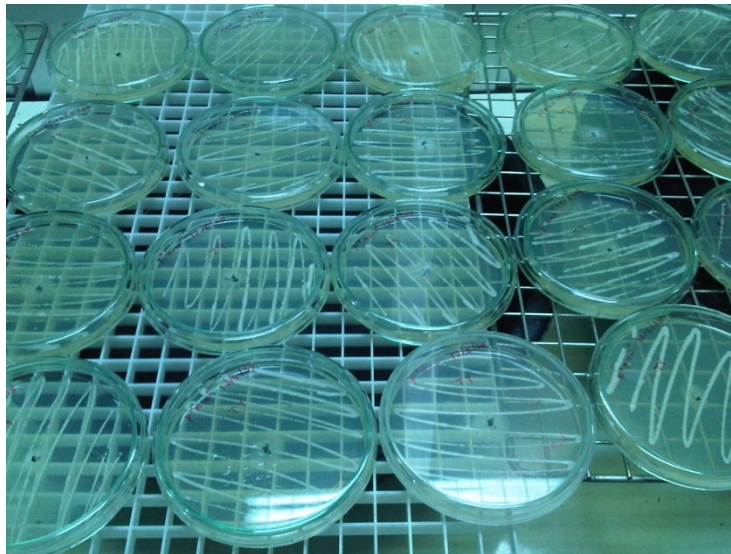
การเตรียมอาหารวุ้นแข็งวายเป็นเอมเอ คือ ละลายยีสต์ แอ็กซ์แทร็ก 3 กรัม มอลต์ แอ็กซ์แทร็ก 3 กรัม เบคโต-เปปโตน 5 กรัม กลูโคส 20 กรัม และวุ้น 20 กรัม ลงในน้ำอาร์โอปริมาตร 1 ลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำให้ปลอดเชื้อ และเทลงจานเพาะเชื้อเหมือนการเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ แต่จะได้อาหารวุ้นแข็งวายเป็นเอมเอ นำลูปเชี่ยยีสต์จากหลอดวุ้นเอียง มาเชี่ยลากบนอาหารวายเป็นเอมเอ ปิดฝาจานด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ยีสต์จะเติบโตเต็มที่ภายใน 3 วัน สังเกตจากการเกิดโคโลนีเดี่ยวกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ



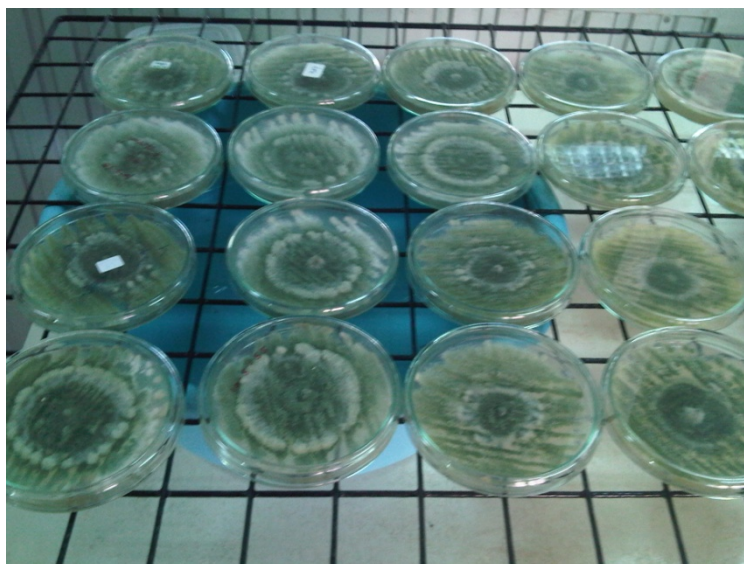
รูปที่ 3.4 แซคคาโรมายซิส ซีรีวิซี RT-P2 เติบโตบนอาหารแข็งวายเป็นเอมเอ

3.3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมระหว่างเชื้อเดี่ยว 2 สายพันธุ์

เชื้อผสมที่เกิดจากการนำไตรโคเดอร์มา รีซี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซีรีวิซี RT-P2 มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารวุ้นแข็งพีดีเอบนจานเดียวกัน จะเรียกอย่างย่อว่าเชื้อผสม RT-P3 วิธีการเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอเหมือนวิธีการทดลอง 3.2.1 ต่างกันตรงที่ ทำการเชี่ยไตรโคเดอร์มา รีซี RT-P1 มาวางตรงกลางจานเท่ากับปลายเข็มเชี่ยเชื้อ แล้วใช้เข็มชนิดลูปเชี่ยแซคคาโรมายซิส ซีรีวิซี RT-P2 จำนวน 3 โคโลนี และนำมาเชี่ยลากลงบนบริเวณที่เหลือของจานเพาะเชื้อพีดีเอที่มีเชื้อราอยู่ตรงกลาง แล้ว ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 3.5 เก็บเชื้อผสม RT-P3 ที่ได้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมักแข็งต่อไป



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.5 เชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (ก) วันแรก (ข) อายุ 7 วัน

3.4 การหาสถานะที่เหมาะสมของการหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อผสม RT-P3

การผลิตเอนไซม์ผสมจากการหมักแข็งกากกะทิเริ่มจากการหาสถานะของการหมักแข็งกากกะทิใช้กากกะทิโดยใช้กากกะทิจากแหล่ง 1 ก่อน ดังรูปที่ 3.6 (ก) หลังจากได้สถานะที่เหมาะสมแล้วจึงทำการหมักแข็งกากกะทิจากแหล่ง 2 ดังรูปที่ 3.6 (ข) ที่สภาวะเหมาะสมเพื่อเปรียบเทียบผลได้ของเอนไซม์ผสม หลังจากนั้นทำการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ผสมจากกากกะทิเป็นครั้งละ 5 กิโลกรัม และทำการอบแห้งเพื่อผลิตผงเอนไซม์ สุดท้ายทำการลดขนาดด้วยเครื่องบดละเอียด ก่อนเก็บไว้ในถุงพลาสติกเคลือบอะลูมิเนียม ซิลปากถุงอย่างดี ดังต่อไปนี้

การศึกษาผลความชื้นเริ่มต้นในอาหารเหลวสูตรเฉพาะพีเอช 5 ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสจากการหมักแข็ง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสในซามแก้ว

3.4.1 การผลิตหัวเชื้อผสม RT-P3 สดในซามแก้วด้วยอาหารเหลวสูตร LM

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาระดับความชื้นเริ่มต้น (ปริมาณอาหารเหลวที่ต้องการ) และระยะเวลาที่ใช้หมักแข็งที่เหมาะสม โดยแปรผันความชื้นเริ่มต้น 4 ระดับ โดยให้กากกะทิตกที่เท่ากับ 50 กรัม แปรผันอาหารเหลว LM ที่ pH 5 ปริมาตรเท่ากับ 50 100 150 และ 200 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยอาหารเหลวมีสูตรดังตารางที่ 3.1 ใช้ระยะเวลาหมัก 7 วัน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS [20] กิจกรรมของเซลลูเลส [21] กิจกรรมของแมนแนนเนส และไซแลนเนส [22] และความเข้มข้นของเชื้อผสมโดยวัดจำนวนเซลล์จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์และใช้ Haemocytometer เป็นอุปกรณ์วัด [23] ทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ

การเตรียมกากกะทิจำนวน 8 ถัง โดยชั่งกากกะทิตลงในถุงพอลิโพรพิลีน ถุงละ 50 กรัม ได้อากาศออกจากถุงพลาสติกให้หมดและรัดปากถุงด้วยหนังยาง ดังรูปที่ 3.6 (ค)

การเตรียมอาหารเหลวสูตร LM ในขวดเตรียมอาหารฟาเกลียวสีฟ้า ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เหย้าให้สารประกอบละลายน้ำและปิดฝาให้แน่น นำไปทำให้ปลอดเชื้อในเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่ 14.7 psig เป็นเวลา 15 นาที นำออกจากเครื่อง วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดพีเอชเท่ากับ 5 ก่อนนำไปใช้ ถ้าพีเอชไม่เท่ากับ 5 ให้ปรับพีเอชด้วยกรดซิตริกหรือ 10 % สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนการนำไปเตรียมหัวเชื้อ

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารเหลวสำหรับการหมักแข็งกากกะทิตด้วยเชื้อผสม RT-P3

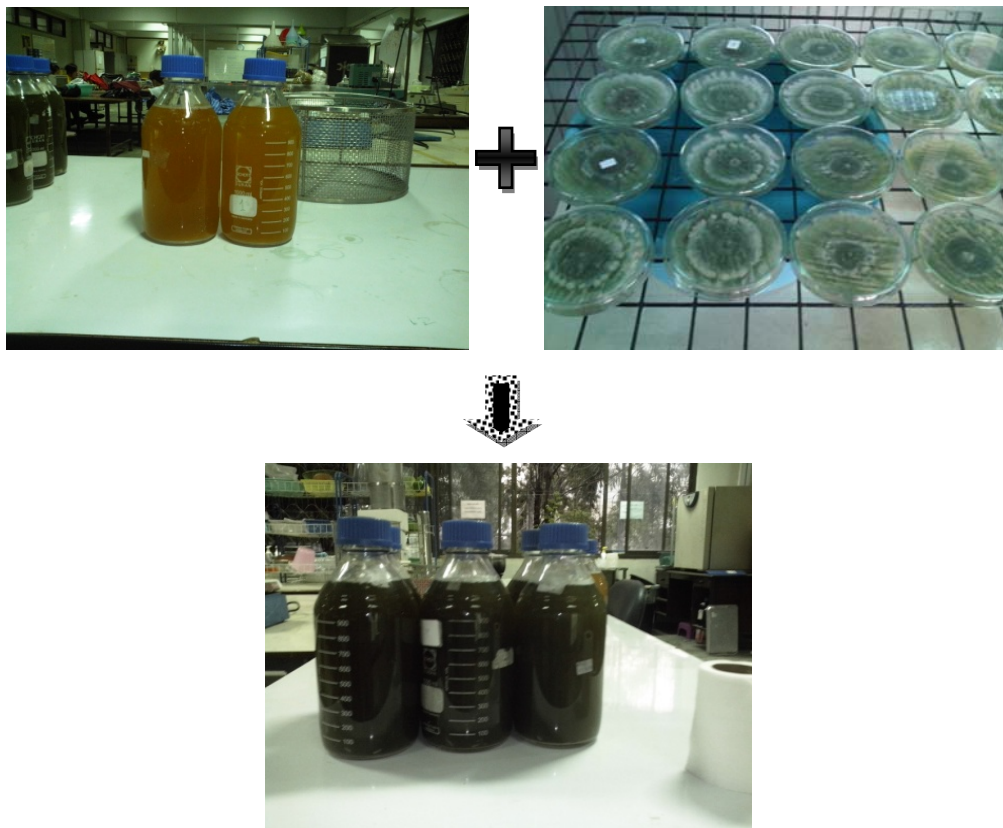
สารประกอบ	LM-pH5
น้ำตาลมะพร้าว (กรัม)	30
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (กรัม)	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O (กรัม)	1
Urea (46 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (กรัม)	8
Phosphate (NPK-0-52-34) (กรัม)	15
น้ำ (กรัม)	1000

การเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในการหมักแข็ง โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จำนวน 3 จาน ชูตเฉพาะเชื้อผสมที่อยู่บนผิวหน้าของอาหารวันแข็ง ลงสูตรอาหาร LM ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากันเครื่องกวนแม่เหล็ก นาน 30 นาที สังเกตสารละลายในขวดเป็นสีเขียวสม่ำเสมอ ดังรูปที่ 3.7



(ค)

รูปที่ 3.6 กากกะทิก่อนการทำให้ปลอดเชื้อ (ก และ ค) แหล่งที่ 1 ตลาด (ข) แหล่งที่ 2 โรงงาน



รูปที่ 3.7 หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลว

การหมักแข็งกากกะทิด้วยสูตรอาหาร LM ในซามแก้วขนาดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำกากกะทิ 50 กรัม ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแต่ละถุงผสมกับอาหารเหลวที่แปรผันปริมาตร 50 100 150 และ 200 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องผสมมูลเน็กซ์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำแผ่นฟิล์มมาปิดปากซามแก้วให้สนิทแล้วเจาะรูระบายอากาศถี่ๆ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 24 ± 2 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3.8 เก็บตัวอย่างทุกวัน ตั้งแต่เริ่มต้นจนครบ 7 วัน เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์เลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ



รูปที่ 3.8 การหมักแข็งกากกะทิในซามแก้วด้วยหัวเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวสูตร LM ที่ pH5

3.4.2 การหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว

เชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้วที่ได้จากการทดลองที่ 3.4.1 ที่สภาวะเหมาะสมถูกนำมาใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์สดสำหรับการหมักแข็งกากกะทิในอาหารเหลว LM โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้วหนัก 50 75 100 และ 125 กรัม ที่อัตราส่วนของกากกะทิต่ออาหารเหลว LM คงที่เท่ากับ 1:3 หรือ กากกะทิ 250 กรัมในอาหารเหลว LM ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ที่ pH เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์เลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ทุกวัน และทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ

3.5 การหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ที่สภาวะเหมาะสม

3.5.1 การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดที่สภาวะเหมาะสม

เมื่อเปรียบเทียบการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว กับหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จากงานเพาะเชื้อ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนเมื่อใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมสดในซามแก้ว การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จากงานเพาะจึงดีกว่า ดังนั้น การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดที่สภาวะเหมาะสมด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ทำการทดลองเหมือน 3.4.1 และใช้ระยะเวลาหมัก 6

วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ตั้งแต่เริ่มต้นจนครบ 6 วัน เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์ลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ

3.5.2 การหมักแข็งกากกะทิจากโรงงานที่สภาวะเหมาะสม

การหมักแข็งกากกะทิจากโรงงานที่สภาวะเหมาะสมด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ทำการทดลองเหมือน 3.4.1 และใช้ระยะเวลาหมัก 6 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน ตั้งแต่เริ่มต้นจนครบ 6 วัน เพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์ลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.9 การหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมจากตลาดและโรงงานในตู้บ่มต้นแบบที่ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$

3.6 การผลิตเอนไซม์ผสมสด CCNR-RT-P3

การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดด้วยเชื้อผสม RT-P3 ด้วยอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสม ในระดับขยายขนาด จากการใช้กากกะทิ 50 กรัมในซามแก้วเป็น 250 กรัมในกล่องพลาสติกใสพอลิโพรพิลีน ซึ่งใช้เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งมีชื่อเป็น เอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3

วิธีการหมักแข็งเพื่อผลิตเอนไซม์ผสมสด CCNR-RT-P3 เหมือนกับข้อที่ 3.4.1 ยกเว้น ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ทำจากกล่องพลาสติกใสพอลิโพรพิลีน ทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 10 ลิตร ฝาถังเป็นพลาสติกใสเจาะรูระบายขนาด 0.5 เซนติเมตร จำนวน 10 รู ล้างให้สะอาด ทำให้แห้ง และผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยรังสี UV ก่อนนำไปใช้ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมได้จากข้อที่ 3.5 คืออัตราส่วน น้ำหนักกากกะทิต่อปริมาตรอาหารเหลว ขยายขนาดการผลิตเป็น 5 เท่าของการผลิตในซามแก้ว ที่พีเอช 5 บ่มในตู้บ่มต้นแบบ (ผลงานวิจัย-2554) ควบคุมอุณหภูมิที่ 24 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้หมักที่สภาวะเหมาะสม ดังรูปที่ 3.10 ถึง 3.12 เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์ลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้ายของการหมัก ทำการวิเคราะห์การทดลองละ 2 ซ้ำ



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.10 (ก) กากกะทิจากตลาดและโรงงาน (ข) หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.11 (ก) การผสมกากกะทิจากตลาดกับหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องกวนผสม (ข) ปิดฝากล่องด้วยฟิล์มพลาสติกเจาะรูถี่ๆ



รูปที่ 3.12 การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 10 ลิตร ด้วยหัวเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมในตู้บ่มต้นแบบ

3.7 การผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3

การอบแห้งเอนไซม์ผสมสด CCNR-RT-P3 ที่สภาวะเหมาะสมด้วยตู้อบแห้งต้นแบบ (ผลงานวิจัย-2554) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3.13 ถึงรูปที่ 3.17 ตามลำดับ อบแห้งจนกระทั่งความชื้นสุดท้ายไม่เกินร้อยละ 13 โดยน้ำหนัก ทำการวัด 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องบดละเอียด และวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลล์ลูลีส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ก่อนและหลังการอบแห้ง ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ



รูปที่ 3.13 การเตรียมเอนไซม์ผสมใส่ตะกร้าก่อนเข้าเครื่องอบแห้ง



รูปที่ 3.14 การคลุกผสมเอนไซม์ก่อนการอบแห้งในกล่องขนาดใหญ่



รูปที่ 3.15 การเรียงตะกร้าอบแห้งที่มีเอนไซม์ผสมเข้าเครื่องอบแห้งต้นแบบ



รูปที่ 3.16 ตำแหน่งการวางตะกร้าในเครื่องอบแห้งต้นแบบ



รูปที่ 3.17 ตัวควบคุมอุณหภูมิภายในเครื่องอบแห้งต้นแบบ

ผลิตภัณฑ์คือ ผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 และนำไปบรรจุลงในถุงพลาสติกเคลือบอะลูมิเนียม ปิดผนึกถุงอย่างดีด้วยเครื่องซีลลดความร้อน ดังรูปที่ 3.18



รูปที่ 3.18 การบรรจุผงเอนไซม์ผสมใส่ถุงเคลือบอะลูมิเนียมกันความชื้น

3.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ในขั้นตอนเดียวจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล

การนำผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 ที่ได้ไปใช้ผลิตเอทานอลในการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ในขั้นตอนเดียว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้คือ

การทดลองครั้งที่ 1 ออกแบบชุดการทดลองแบบสุ่ม โดยแปรผันพารามิเตอร์ 4 ตัวแปร และแป้นผันแต่ละตัวแปรเป็น 5 ระดับ คือ น้ำหนักเป็นกรัมของกากกะทิ (4, 6, 8, 10, 12) ผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 (1, 2, 3, 4, 5), น้ำตาลมะพร้าว (0, 1, 2, 3, 4) ในอาหารเหลวปริมาตรคงที่ 100 มิลลิลิตร และเวลาที่ใช้ในการหมัก (2, 4, 6, 8, 10 วัน) ชุดการทดลองแบบสุ่มจึงมีทั้งสิ้น 27 การทดลอง ดังตารางที่ 3.2 ทำการทดลอง 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลโดยวิธีของ William and Reese, 1950 [24] การทดลองละ 2 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการคำนวณมีค่าสูงสุดที่สภาวะนั้น

การทดลองครั้งที่ 2 จะใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอลหาสภาวะที่เหมาะสม โดยแปรผันพารามิเตอร์ 4 ตัวแปร และแป้นผันแต่ละตัวแปรเป็น 5 ระดับ คือ น้ำหนักเป็นกรัมของกากกะทิ (2, 4, 6, 8, 10) ผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 (1, 2, 3, 4, 5), น้ำตาลมะพร้าว (0, 1, 2, 3, 4) ในอาหารเหลว ปริมาตรคงที่ 100 มิลลิลิตร และเวลาที่ใช้ในการหมัก (1, 3, 5, 7, 9 วัน) ชุดการทดลองแบบสุ่มจึงมีทั้งสิ้น 25 การทดลอง ดังตารางที่ 3.3 ทำการทดลอง 2 ชั่วโมง เก็บของเหลวตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลโดยวิธีของ William and Reese, 1950 ตามเวลาหมักที่กำหนดไว้ [24] การทดลองละ 3 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการคำนวณมีค่าสูงสุดที่สภาวะนั้น

วิธีการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ในขั้นตอนเดียวจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล มีรายละเอียดดังนี้ คือ ชั่งน้ำหนักกากกะทิลงในถุงพลาสติกพอลิโพรพิลีนใส่อากาศ รััดด้วยหนังยางให้แน่นก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 14.7 psig นาน 15-20 นาที ทำอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่างๆ ให้ปลอดเชื้อที่สภาวะเดียวกัน

ขั้นตอนการหมักกึ่งเหลวเริ่มจากเทกากกะทิปลอดเชื้อตามน้ำหนักของแต่ละการทดลองลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่ผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 ตามน้ำหนักของการทดลองนั้นๆ แล้วจึงใส่อาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรอาหารเหลวที่ใช้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาขวดรูปชมพู่ด้วยสำลีปลอดเชื้อ นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที เปิดและปิดเครื่องเขย่าช่วงกลางวันและกลางคืน ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 การออกแบบชุดการทดลองแบบสุ่มของการหมักกึ่งเหลวแบบกะ

การทดลองที่	ตัวแปรอิสระ			
	กากกะทิ (กรัม)	ผงเอนไซม์ผสม (กรัม)	น้ำตาล (กรัม)	เวลาที่ใช้ (วัน)
1	4	3	2	6
2	8	1	2	6
3	8	3	0	6
4	8	3	2	2
5	8	3	2	6
6	12	3	2	6
7	8	5	2	6
8	8	3	4	6
9	8	3	4	10
10	8	3	2	6
11	6	2	1	4
12	6	2	1	8
13	6	2	3	4
14	6	2	3	8
15	8	3	2	6
16	6	4	3	8
17	6	4	3	4
18	6	4	1	4
19	6	4	1	8
20	10	4	3	8
21	10	4	3	4
22	10	4	1	4
23	10	4	1	8
24	10	2	1	4
25	10	2	1	8
26	10	2	3	4
27	10	2	3	8

ตารางที่ 3.3 การออกแบบชุดการทดลองแบบสุ่มด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

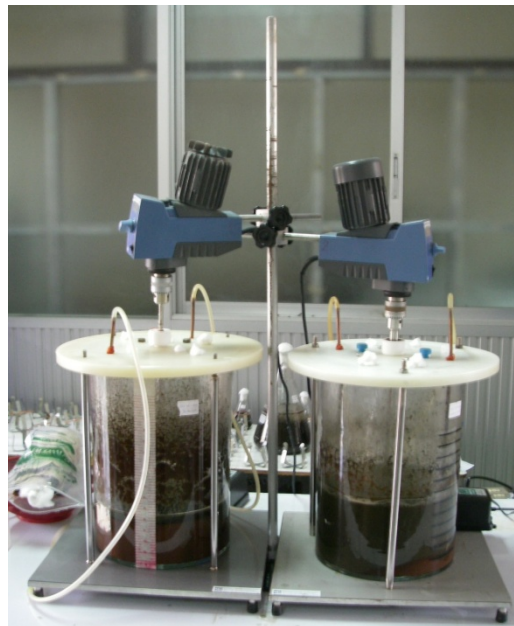
การทดลองที่	ตัวแปรอิสระ			
	กากกะทิ (กรัม)	ผงเอนไซม์ผสม (กรัม)	น้ำตาล (กรัม)	เวลาที่ใช้ (วัน)
1	2	1	0	1
2	4	1	1	3
3	6	1	2	5
4	8	1	3	7
5	10	1	4	9
6	2	2	4	9
7	4	2	0	1
8	6	2	1	3
9	8	2	2	5
10	10	2	3	7
11	2	3	3	7
12	4	3	4	9
13	6	3	0	1
14	8	3	1	3
15	10	3	2	5
16	2	4	2	5
17	4	4	3	7
18	6	4	4	9
19	8	4	0	1
20	10	4	1	3
21	2	5	1	3
22	4	5	2	5
23	6	5	3	7
24	8	5	4	9
25	10	5	0	1

3.9 การหมักกึ่งเหลวแบบกะในขั้นตอนเดียวจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอลที่สภาวะเหมาะสม

วิธีเตรียมกากกะทิ อาหารเหลว เหมือนกับการทดลองข้อที่ 3.8 ยกเว้นทำการทดลองที่สภาวะเหมาะสม โดยทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแก้ว ทรงกระบอก ขนาดปริมาตร 20 ลิตร บรรจุกากกะทิและผงเอนไซม์ มอเตอร์ไฟฟ้าปรับความเร็วรอบได้ใช้หมุนใบกวน ด้านข้างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแก้วมีท่อที่ปลายท่อติดดิฟฟิวเซอร์เพื่อเติมอากาศจำนวน 2-3 ท่อ ปริมาตรที่ใช้ในการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์เริ่มต้นที่ 5 ลิตร โดยใช้กากกะทิและผงเอนไซม์ขยายขนาดขึ้น 30 เท่าของข้อมูลการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ที่สภาวะเหมาะสม (จากการทดลองที่ 3.8) ดังรูปที่ 3.19 (ซ้ายมือ) เก็บของเหลวตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสทุกวัน ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.10 กระบวนการหมักกึ่งเหลวแบบ Fed-batch เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCN-RT-P3

วิธีการหมักกึ่งเหลวแบบ Fed-batch ในถังปฏิกรณ์แก้ว ขนาด 20 ลิตร เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 ในขั้นตอนเดียว วิธีการทดลองเหมือนการทดลองที่ 3.9 ยกเว้นมีการเติมอาหารเหลวที่มีน้ำตาลปีปเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ทุกๆ วัน จำนวน 500 มิลลิลิตร ดังรูปที่ 3.19 (ขวามือ) เก็บของเหลวตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ การเติบโตของเชื้อผสม กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสทุกวันตั้งแต่เริ่มต้น ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.19 การหมักกึ่งเหลวแบบกะ (ซ้ายมือ) และกึ่งกะ (ขวามือ) ที่สภาวะเหมาะสมในถังปฏิกรณ์แก้ว ขนาด 20 ลิตร เพื่อผลิตเอทานอลจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3