

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวิจัย เรื่อง “การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาสองขั้นตอนจากกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้เอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยว” ประกอบด้วยผลการวิจัยจาก 2 กระบวนการ (1) กระบวนการหมักแข็งจากกากกะทิด้วยเชื้อผสม RT-P3 ในอาหารเหลว LM-pH5 เพื่อผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 และ (2) กระบวนการหมักกึ่งเหลวแบบกะ (Batch) และกึ่งกะ (Fed-batch) เพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้การหมักกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 ในอาหารเหลว LM-pH5 ดังรายละเอียดต่อไปนี้

#### 4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากกะทิ

กากกะทิจาก 2 แหล่ง คือกากกะทิจากตลาดการเคหะ คลองหก ัญบุรี ปทุมธานี และ กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานผลิตน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น จ. ชุมพร ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ในกากกะทิประกอบด้วยเซลลูโลสมากที่สุด รองลงมาคือลิกนิน และที่น้อยที่สุดคือเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากตัวอย่างกากกะทิมีเปลือกสีน้ำตาลที่ติดอยู่กับเนื้อมะพร้าวผสมอยู่ด้วย พิจารณาได้จากรูปที่ 3.6 และผลการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 4.1

ร้อยละความแตกต่างของสมบัติทางเคมีระหว่างกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน พบว่า มีค่าลิกนินใกล้เคียงกันกากกะทิจากตลาดมีค่าเซลลูโลสมากกว่าประมาณร้อยละ 8.24 ขณะที่กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานมีค่าร้อยละเฮมิเซลลูโลสไขมัน และเถ้า มากกว่าอยู่เท่ากับ 3.18, 3.04 และ 1.13 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากกะทิจากตลาดและโรงงาน

| วัตถุดิบ                 | ร้อยละ โดยน้ำหนัก |          |              |       |      |          |
|--------------------------|-------------------|----------|--------------|-------|------|----------|
|                          | ลิกนิน            | เซลลูโลส | เฮมิเซลลูโลส | ไขมัน | เถ้า | ความชื้น |
| กากกะทิจากตลาด           | 31.17             | 48.68    | 0.39         | 19.33 | 0.43 | 6        |
| กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน | 32.06             | 40.44    | 3.57         | 22.37 | 1.56 | 6        |

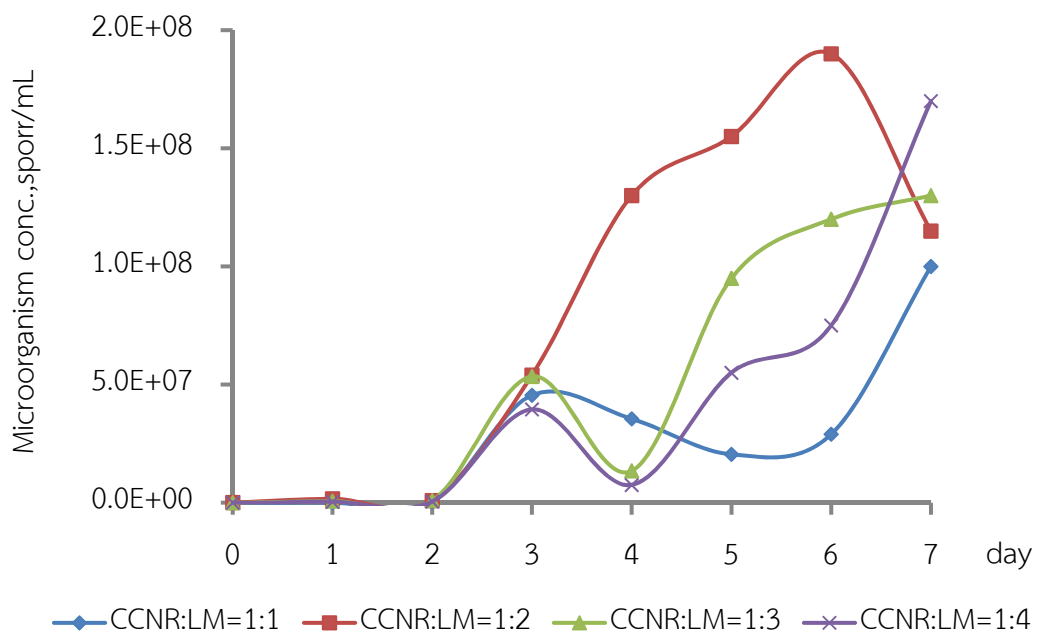
ผลของการวัดการกระจายขนาดอนุภาคในกากกะทิ พบว่า ขนาดอนุภาคกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานมีขนาดเฉลี่ยโดยมวลประมาณ 1.94 และ 2.23 มิลลิเมตร และเฉลี่ยโดยปริมาตรประมาณ 2.29 และ 2.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ ขนาดเฉลี่ยโดยมวลและโดยปริมาตรของกากกะทิจากตลาดมีขนาดเล็กกว่ากากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานร้อยละประมาณ 15 และ 6 ตามลำดับ

## 4.2 ผลของปริมาณอาหารเหลวต่อการหมักแข็งกากกะทิด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3

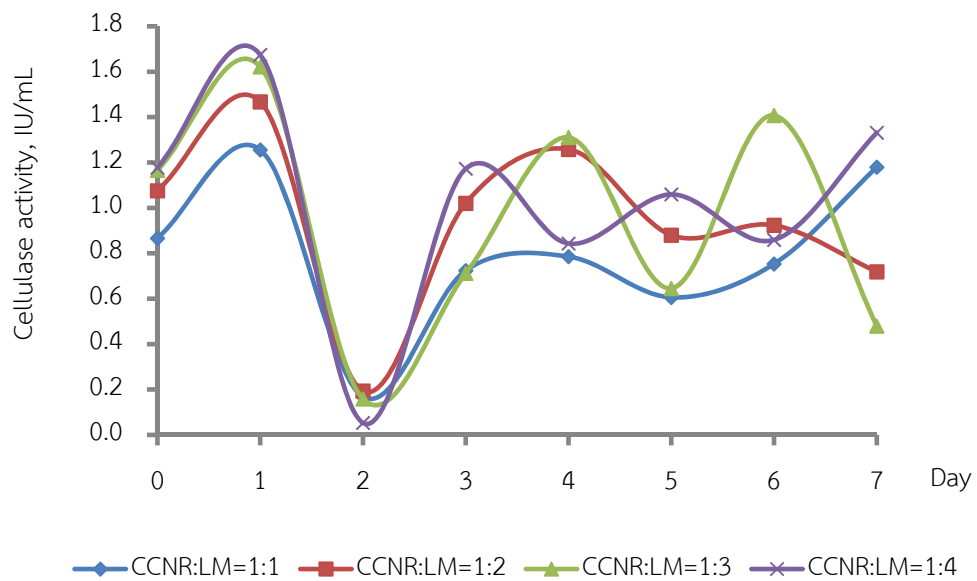
### 4.2.1 ผลของการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จากงานเพาะเชื้อ

การหมักแข็งกากกะทิจากตลาด (CCNR, M) โดยให้น้ำหนักกากกะทิตดที่เท่ากับ 50 กรัม แปรผันปริมาณอาหารเหลว (LM) ที่ 50 100 150 และ 200 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราส่วน CCNR:LM (น้ำหนักต่อปริมาตร) คือ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ กับเชื้อจุลินทรีย์ผสม 3 จาน ในอาหารเหลว 1000 มิลลิลิตร ผลการทดลอง พบว่า หลังจากจุลินทรีย์ผสมใช้เวลาปรับตัว 2 วัน การเติบโตของจุลินทรีย์ที่ CCNR:LM เท่ากับ 1:2 เชื้อจุลินทรีย์เติบโตได้สูงที่สุด มีความเข้มข้นเท่ากับ  $1.9 \times 10^8$  สปอร์/มิลลิลิตร ระยะเวลาหมักนาน 6 วัน และการเติบโตลดลงในระยะเวลาต่อมา เนื่องจากที่สภาวะนี้เมื่อถึงระยะเวลาหมัก 7 วัน มีอาหารเหลือน้อยจึงไม่เพียงพอต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ส่วนการเติบโตของจุลินทรีย์ของการหมักแข็งกากกะทิที่ CCNR:LM เท่ากับ 1:3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 5 วันเป็นต้นไปและมีอัตราการเติบโตดีกว่าที่ CCNR:LM เท่ากับ 1:1 และ 1:4 การเติบโตที่ระยะเวลา 4 วันของ CCNR:LM เท่ากับ 1:3 และ 1:4 มีค่าต่ำอาจจะเป็นปัญหาของการสุ่มตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ดังรูปที่ 4.1

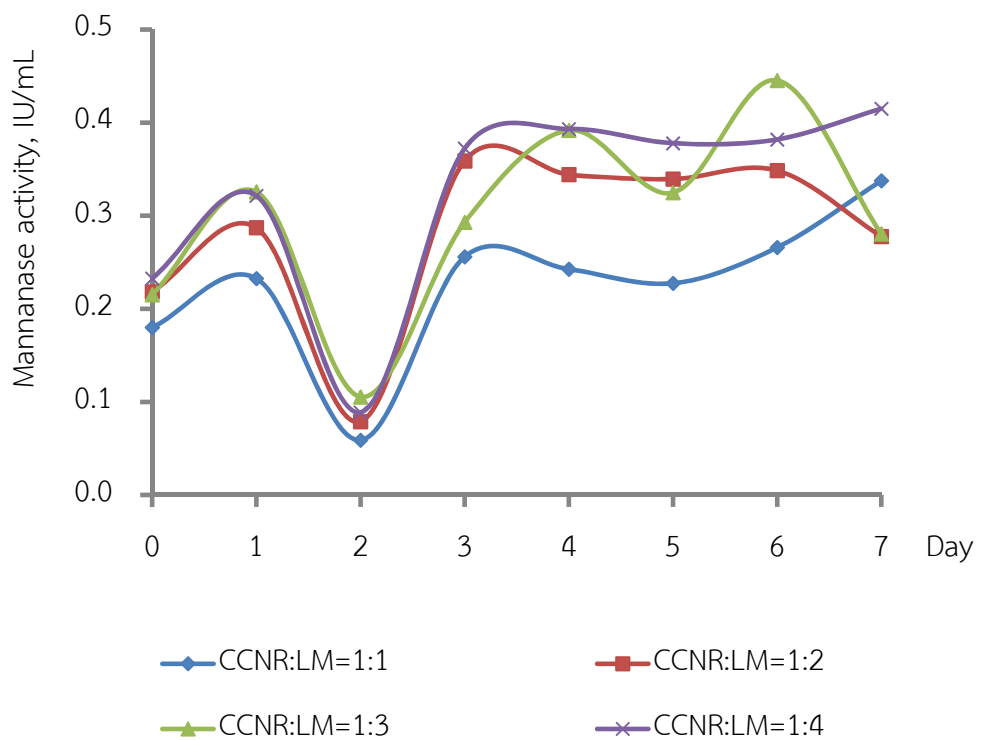
ดังนั้น งานวิจัยนี้เลือกอัตราส่วนของ CCNR:LM เท่ากับ 1:3 เพื่อใช้ในการหมักแข็งระดับขยายขนาดต่อไป รวมทั้งใช้สภาวะนี้ทำการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ที่ได้จากการหมักแข็งในระดับปฏิบัติการและการขยายขนาดด้วย



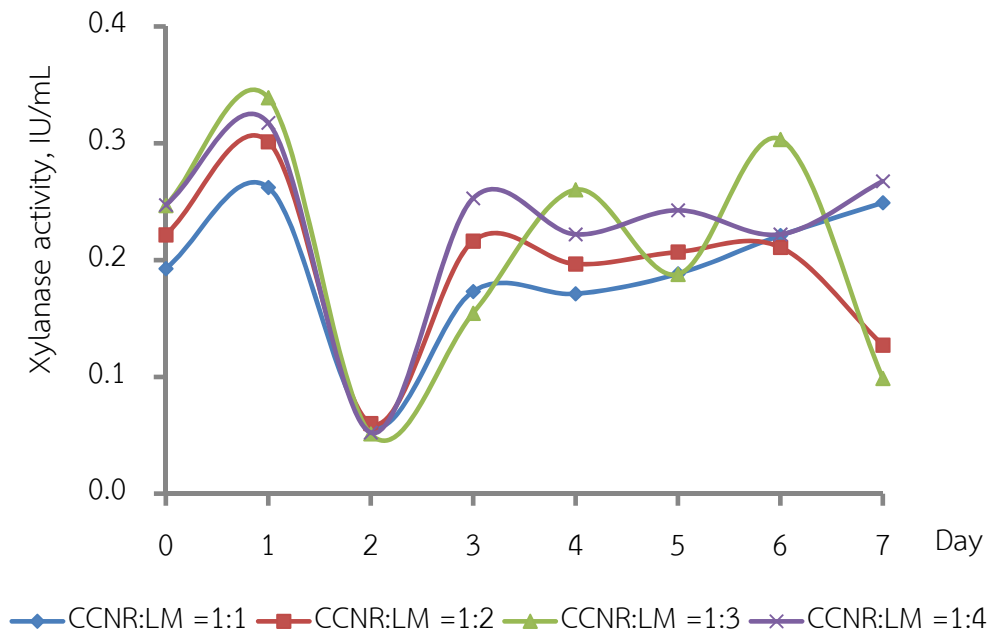
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4



รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเซลลูเลสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4

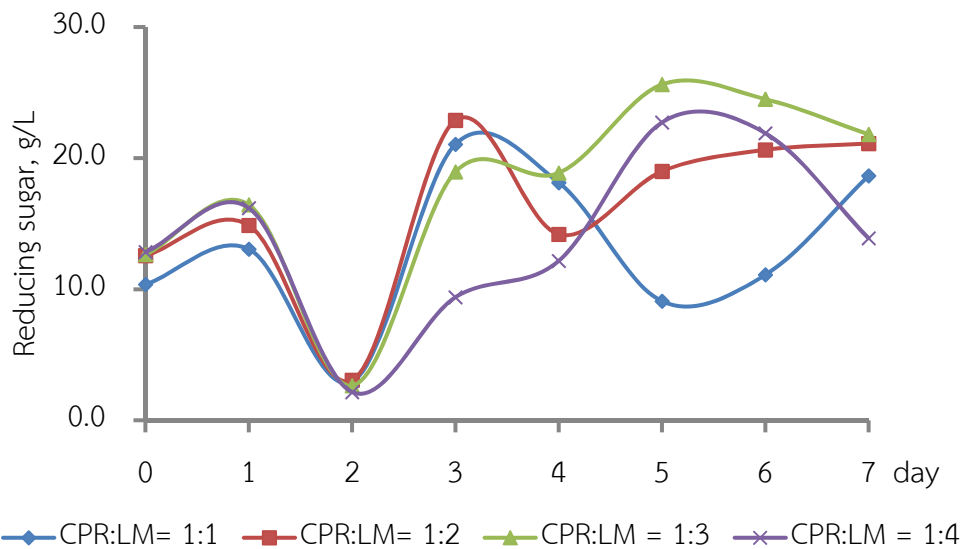


รูปที่ 4.3 กิจกรรมของแมนแนนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4



รูปที่ 4.4 กิจกรรมของไซแลนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ คือ กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ มีค่ามากที่สุดที่อัตราส่วน CCNR:LM เท่ากับ 1:3 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ถึง 4.4 ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส เท่ากับ 1.41, 0.45 และ 0.30 IU/mL ที่ระยะเวลาหมักนาน 6 วัน ตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 25.62 g/L ระยะเวลาหมักนาน 5 วัน ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 น้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลว (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4

ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดด้วยจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลว LM ที่ pH เท่ากับ 5 เพื่อการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ได้มากที่สุด คือที่อัตราส่วนกากกะทิจากตลาดต่ออาหารเหลวเท่ากับ 1:3 ระยะเวลาที่ใช้หมักนาน 6 วัน ผลจากการทำการทดลองที่สภาวะเหมาะสมพบว่า กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ที่ระยะเวลาหมักนาน 6 วันมีค่าประมาณ 0.98 FPU/mL, 0.28 IU/mL และ 0.21 IU/mL ตามลำดับ น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าประมาณ 38.80 g/L และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมประมาณ  $4.27 \times 10^7$  cell/mL ดังตารางที่ 4.2

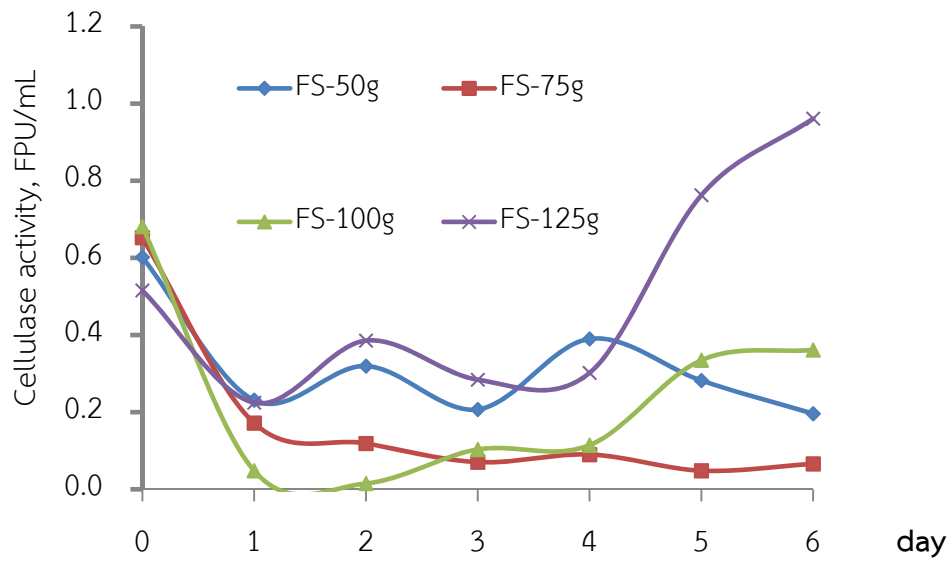
ตารางที่ 4.2 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมจากการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 จากงานเพาะเชื้อด้วยอาหารเหลว LM ที่ pH เท่ากับ 5 ที่สภาวะเหมาะสม

| ระยะเวลาที่ใช้หมัก | กิจกรรมของ        |                   |                  | น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) | ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม (cell/mL) |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------------------------|
|                    | เซลลูเลส (FPU/mL) | แมนแนนเนส (IU/mL) | ไซแลนเนส (IU/mL) |                     |                                       |
| 0                  | 0.88              | 0.19              | 0.17             | 9.97                | $7.07 \times 10^5$                    |
| 1                  | 0.23              | 0.09              | 0.07             | 4.63                | $2.31 \times 10^5$                    |
| 2                  | 0.27              | 0.13              | 0.07             | 4.96                | $2.97 \times 10^5$                    |
| 3                  | 1.17              | 0.31              | 0.25             | 21.11               | $1.24 \times 10^7$                    |
| 4                  | 1.04              | 0.28              | 0.20             | 30.02               | $3.28 \times 10^7$                    |
| 5                  | 1.03              | 0.31              | 0.19             | 32.05               | $5.26 \times 10^7$                    |
| 6                  | 0.98              | 0.45              | 0.21             | 38.80               | $4.27 \times 10^7$                    |

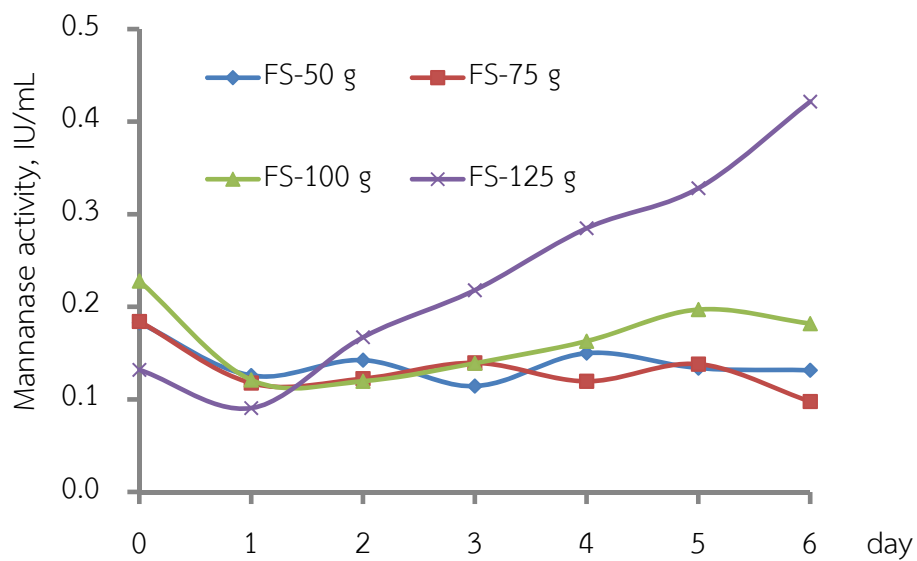
#### 4.2.2 ผลของการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว

การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดในอาหารเหลวด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว กำหนดตัวแปรคงที่คือกากกะทิเท่ากับ 250 กรัม และอาหารเหลว LM ที่ pH 5 ปริมาตรเท่ากับ 750 มิลลิลิตร ทำการหมักแข็งกากกะทิในอาหารเหลว LM โดยแปรผันหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้วเท่ากับ 50 75 100 และ 125 กรัม ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า กิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส ไซแลนเนส ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และจุลินทรีย์ผสม RT-P3 มีค่ามากที่สุดเมื่อใช้หัวเชื้อผสมในซามแก้วเริ่มต้นเท่ากับ 125 กรัม ดังรูปที่ 4.6 ถึง 4.10 ตามลำดับ

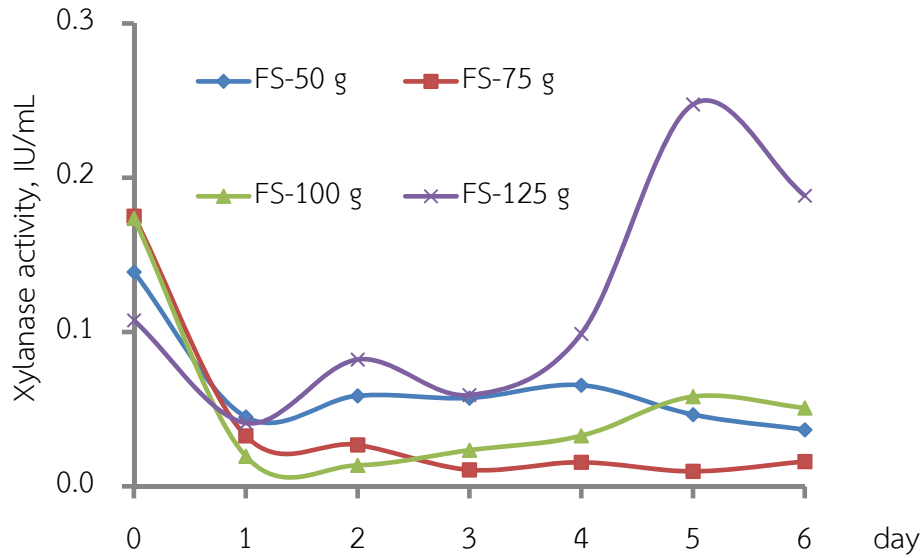
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เชื้อจุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเชื้อและหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมในซามแก้ว พบว่า หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเชื้อให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ น้ำตาลรีดิวซ์ และการเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมสดในซามแก้ว ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3



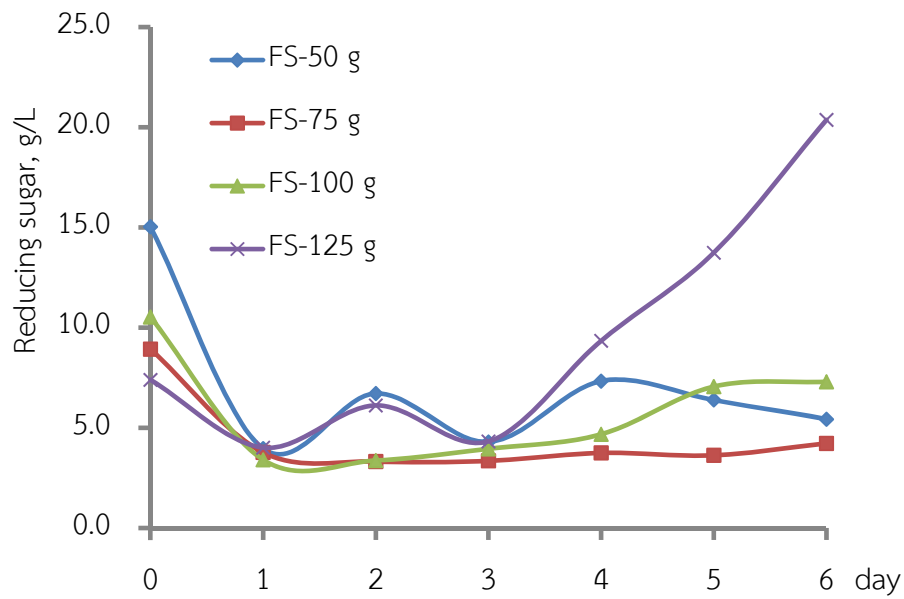
รูปที่ 4.6 กิจกรรมของเซลลูเลสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลือคงที่ แปรรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ



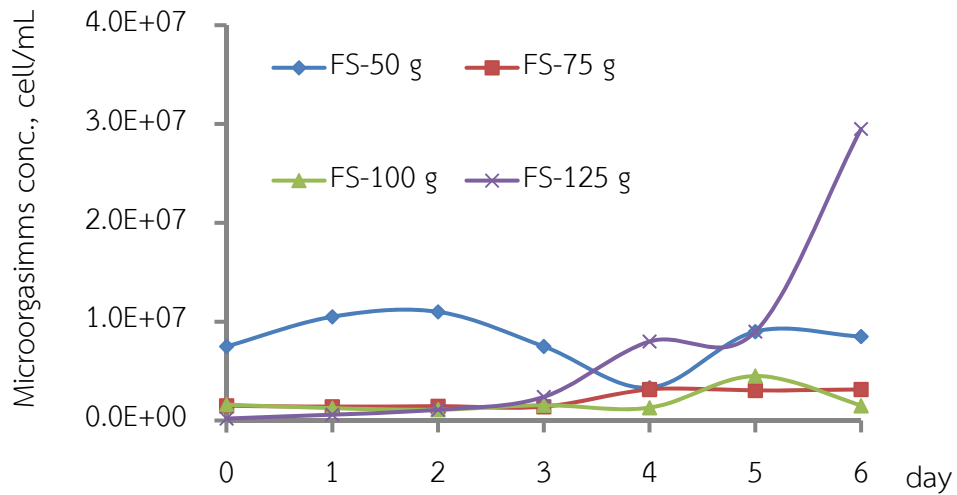
รูปที่ 4.7 กิจกรรมของแมนแนนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลือคงที่ แปรรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ



รูปที่ 4.8 กิจกรรมของไซแลนเนสกับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลือคงที่ แปรรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ



รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิต่อปริมาณอาหารเหลือคงที่ แปรรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่น้ำหนักต่างๆ



รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสม RT-P3 กับเวลาที่ได้จากการหมักแข็งที่อัตราส่วนกากกะทิ ต่อปริมาณอาหารเหลวคงที่ แปรรูปหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว (FS) ที่ น้ำหนักต่างๆ

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของ จุลินทรีย์ผสมจากการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดในซามแก้ว ปริมาณต่างๆ ที่อัตราส่วนกากกะทิต่ออาหารเหลวคงที่เท่ากับ 1:3

| ระยะเวลา<br>ที่ใช้หมัก | กิจกรรมของ           |                      |                     | น้ำตาลรีดิวซ์<br>(g/L) | ความเข้มข้นของ<br>จุลินทรีย์ผสม<br>(cell/mL) |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------------------------------|
|                        | เซลลูเลส<br>(FPU/mL) | แมนแนนเนส<br>(IU/mL) | ไซแลนเนส<br>(IU/mL) |                        |                                              |
| 0                      | 0.52                 | 0.13                 | 0.11                | 7.39                   | $2.05 \times 10^5$                           |
| 1                      | 0.22                 | 0.09                 | 0.04                | 4.01                   | $6.00 \times 10^5$                           |
| 2                      | 0.39                 | 0.17                 | 0.08                | 6.12                   | $1.10 \times 10^5$                           |
| 3                      | 0.28                 | 0.22                 | 0.06                | 4.32                   | $2.40 \times 10^7$                           |
| 4                      | 0.30                 | 0.28                 | 0.10                | 9.35                   | $8.00 \times 10^7$                           |
| 5                      | 0.76                 | 0.33                 | 0.25                | 13.74                  | $9.00 \times 10^7$                           |
| 6                      | 0.96                 | 0.42                 | 0.19                | 20.37                  | $2.95 \times 10^7$                           |

ผลการวิจัยพบว่า การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็งพีดีเอให้ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เซลลูเลส แมนแนนเนส และไซ

แลนเนส มากกว่าการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากขามแก้ว เนื่องจากจุลินทรีย์จากงานเพาะเลี้ยงได้สารอาหารที่ดีกว่าจากกากกะทิ ซึ่งกากกะทิมีลิกนินผสมอยู่ ลิกนินเป็นสารโมเลกุลใหญ่ยับยั้งการย่อยสลาย จึงทำให้มีค่ากิจกรรมของจุลินทรีย์น้อยกว่า อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ผสมจากขามแก้วสามารถเติบโตได้ดีกว่าจากงานเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการหมัก 3 วันขึ้นไป และได้ใช้น้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายในการเติบโตทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลง กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลงด้วย ดังนั้นการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมในขามแก้วจึงอาจจะต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่า 6 วัน เมื่อเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเลี้ยง

#### 4.2.2 ผลของการหมักกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานที่สภาวะเหมาะสมในระดับปฏิบัติการ

การทดลองนี้จะเป็นการผลิตเอนไซม์ผสมในกล่องขนาดเล็กโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ ปริมาณอาหารเหลว (มิลลิลิตร) ต่อกากเนื้อมะพร้าว (กรัม) ที่อัตราส่วน 3:1 หรือ 150 ml:50 g เพื่อเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ผสมระหว่างกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน ก่อนการหมักวัตถุดิบทั้งสองมีสีต่างกัน ดังรูปที่ 4.11 เนื่องจากกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานเป็นของเหลือแห้งที่ผ่านกระบวนการสกัดเย็นเพื่อผลิตน้ำมันมะพร้าว ที่ใช้จุลินทรีย์ย่อยสลายแยกน้ำมันมะพร้าวออกจากเนื้อมะพร้าว ส่วนกากกะทิจากตลาดเป็นของเหลือแห้งที่ผ่านการคั้นน้ำกะทิออก



รูปที่ 4.11 ความแตกต่างของสีระหว่างกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ผสม RT-P 3 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีซีอี RT-P1 และยีสต์แซคคาโรมายซิส ซีวีวีซีอี RT-P2 ในกากกะทิ และกากเนื้อมะพร้าวจะมีการแตกแขนงของเส้นใยขึ้น และเหนียวน้ำให้เกิดแขนงอันที่สองและสามต่อไปเรื่อยๆ โดยการแตกแขนงของจุลินทรีย์ผสมจะมีลักษณะขยายออกไปบนสับสเตรทที่อยู่ในขามแก้วและในกล่อง โดยจะเติบโตจากผิวหน้าและค่อยๆ ลึกลงไปในสับสเตรท การเติบโตนี้ต้องการใช้อากาศ ความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งมีค่าประมาณ  $24 \pm 2$  องศาเซลเซียส ทำให้เกิดสปอร์ซึ่งเห็นได้ด้วยตาเป็นสีเขียว หรือในที่นี้จะเรียกว่าเอนไซม์ผสม ยิ่งใช้เวลาในการหมักนาน เอนไซม์ผสมนี้จะมีความแข็งแรงที่สุดจนถึงจุดจุดหนึ่งก็จะทำให้การเติบโตของจุลินทรีย์ผสมลดลงเนื่องจากสารอาหารลดลง ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดที่ระยะเวลาเริ่มต้น (ซ้าย) และ 7 วัน (ขวา)

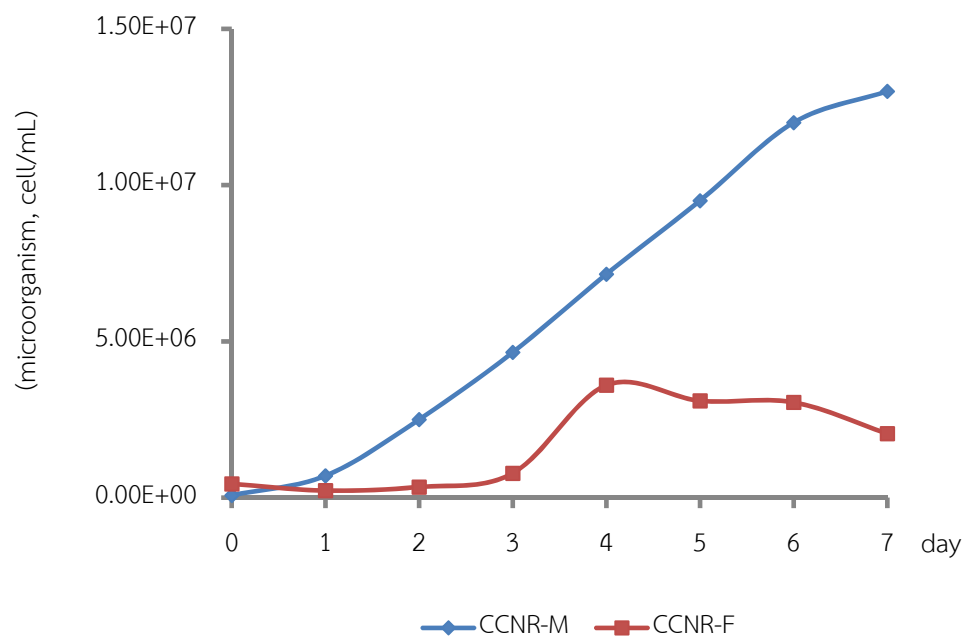


รูปที่ 4.13 เปรียบเทียบการหมักแข็งกากนมมะพร้าวจากโรงงานที่ระยะเวลาเริ่มต้น (ซ้าย) และ 7 วัน (ขวา)

เปรียบเทียบผลการเติบโตของจุลินทรีย์ผสมระหว่างกากกะทิจากตลาดและโรงงาน พบว่า ที่ระยะเวลาการหมัก 4 วัน จุลินทรีย์ผสมเติบโตในกากกะทิได้ดีกว่าในกากนมมะพร้าวจากโรงงาน และสามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดและโรงงานที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน มีค่าประมาณ  $7.15 \times 10^6$  และ  $3.10 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน ความเข้มข้นจุลินทรีย์ในกากกะทิมีค่าสูงสุดเท่ากับ  $1.30 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ในกากนมมะพร้าวมีค่าลดลง ( $2.05 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.14 การใช้กากกะทิจากตลาดเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ผสมดีกว่ากากนมมะพร้าวจากโรงงาน เพราะกากกะทิจากตลาดมีเซลลูโลสมากกว่า และมีเฮมิเซลลูโลส ไขมัน และเถ้าน้อยกว่า (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักแข็งกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)

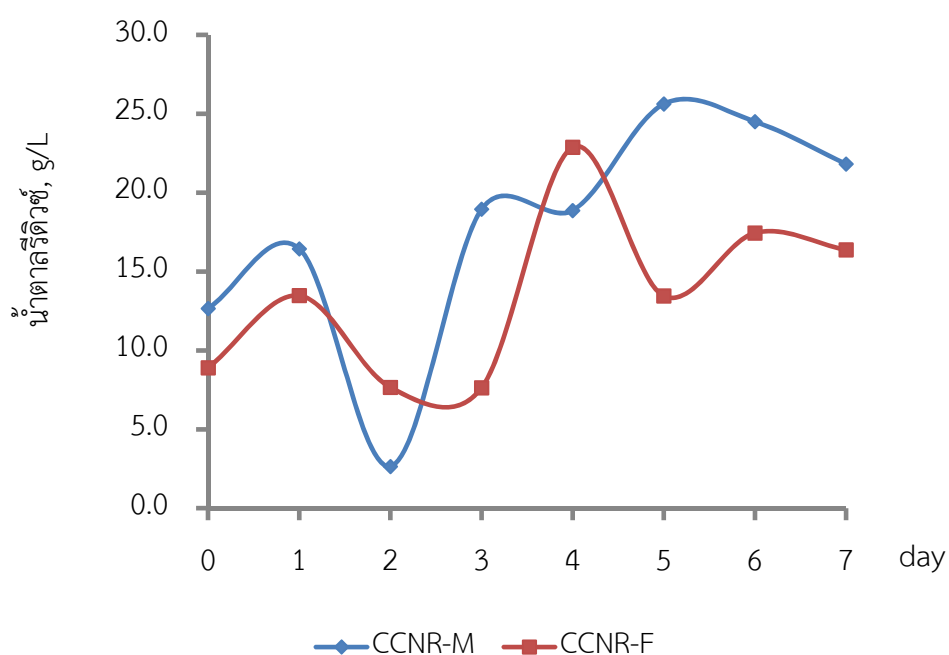
| ระยะเวลาหมัก (วัน) | ความเข้มข้นจุลินทรีย์ผสม (สปอร์ต่อมิลลิลิตร) |                    |
|--------------------|----------------------------------------------|--------------------|
|                    | CCNR-M                                       | CCNR-F             |
| 0                  | 7.55E+04                                     | $4.40 \times 10^5$ |
| 1                  | 7.00E+05                                     | $2.25 \times 10^5$ |
| 2                  | 2.50E+06                                     | $3.40 \times 10^5$ |
| 3                  | 4.65E+06                                     | $7.80 \times 10^5$ |
| 4                  | 7.15E+06                                     | $3.60 \times 10^6$ |
| 5                  | 9.50E+06                                     | $3.10 \times 10^6$ |
| 6                  | 1.20E+07                                     | $3.05 \times 10^6$ |
| 7                  | 1.30E+07                                     | $2.05 \times 10^6$ |



รูปที่ 4.14 โปรไฟล์การเติบโตของจุลินทรีย์ผสมสำหรับการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ผสมของกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)

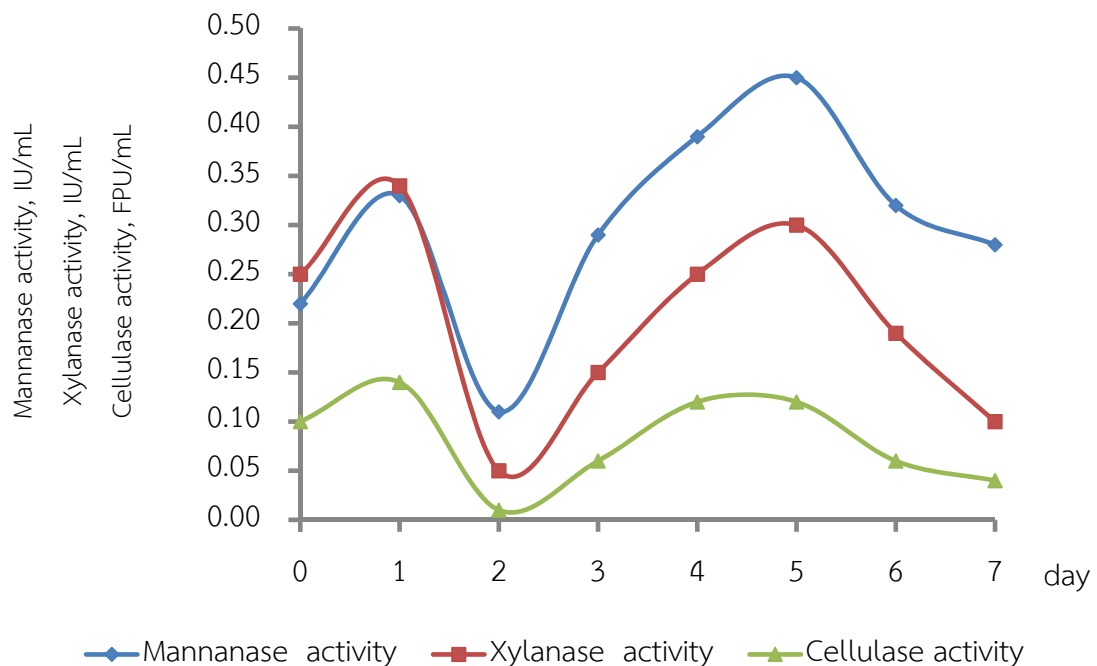
| อายุ<br>(วัน) | น้ำตาลรีดิวซ์<br>(g/L) |        | กิจกรรมแมนแนนเนส<br>(IU/mL) |        | กิจกรรมไซแลนเนส<br>(IU/mL) |        | กิจกรรมเซลลูเลส<br>(FPU/mL) |        |
|---------------|------------------------|--------|-----------------------------|--------|----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
|               | CCNR-M                 | CCNR-F | CCNR-M                      | CCNR-F | CCNR-M                     | CCNR-F | CCNR-M                      | CCNR-F |
| 0             | 12.662                 | 8.905  | 0.22                        | 0.15   | 0.25                       | 0.15   | 0.10                        | 0.05   |
| 1             | 16.443                 | 13.483 | 0.33                        | 0.24   | 0.34                       | 0.16   | 0.14                        | 0.09   |
| 2             | 2.649                  | 7.662  | 0.11                        | 0.18   | 0.05                       | 0.12   | 0.01                        | 0.07   |
| 3             | 18.955                 | 7.637  | 0.29                        | 0.23   | 0.15                       | 0.16   | 0.06                        | 0.05   |
| 4             | 18.868                 | 22.877 | 0.39                        | 0.25   | 0.25                       | 0.17   | 0.12                        | 0.07   |
| 5             | 25.622                 | 13.458 | 0.45                        | 0.21   | 0.30                       | 0.15   | 0.12                        | 0.06   |
| 6             | 24.502                 | 17.446 | 0.32                        | 0.45   | 0.19                       | 0.25   | 0.06                        | 0.10   |
| 7             | 21.816                 | 16.376 | 0.28                        | 0.38   | 0.10                       | 0.24   | 0.04                        | 0.09   |



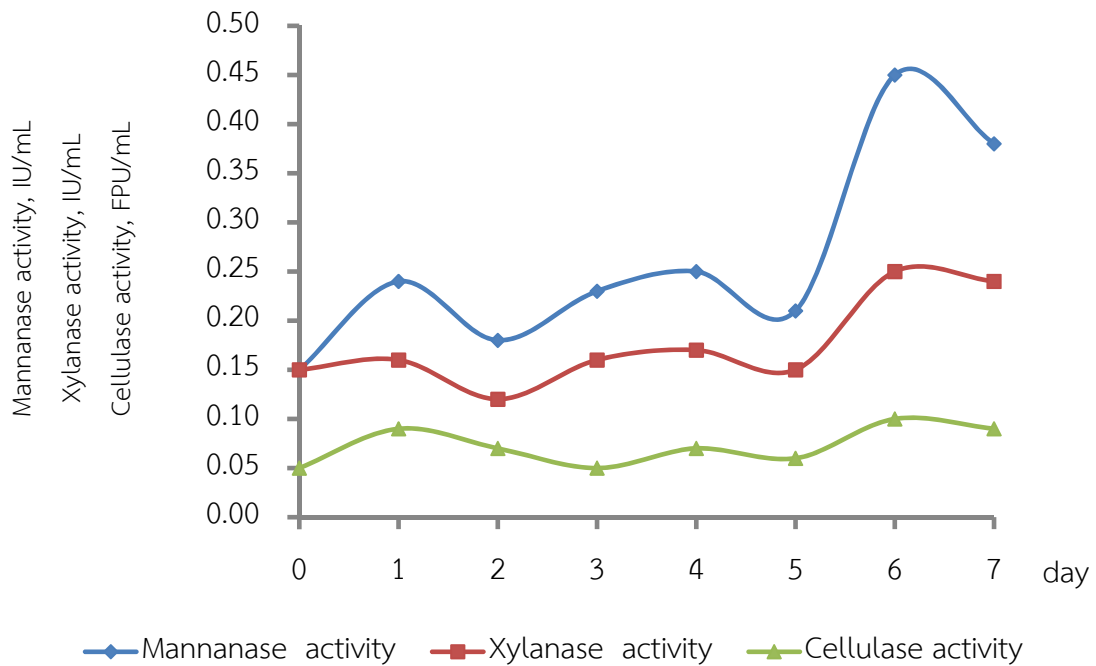
รูปที่ 4.15 โปรไฟล์น้ำตาลรีดิวซ์ของกากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F)

ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักแข็งเมื่อใช้กากกะทิจากตลาด (CCNR-M) เป็นสับสเตรท มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 25.62 g/L ที่ระยะเวลาหมักนาน 5 วัน ส่วนกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 22.88 g/L ที่ระยะเวลาหมักนาน 4 วัน ดังรูปที่ 4.15 ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการเติบโตของจุลินทรีย์ผสม (รูปที่ 4.14) นั่นคือจำนวนจุลินทรีย์ผสมมากจะย่อยสลายเซลลูโลสได้เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาหมัก 3 ถึง 5 วัน แต่ที่จำนวนจุลินทรีย์มากเกินไปกว่าสารอาหารที่เหลืออยู่จะทำให้ให้น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปในการเติบโตของจุลินทรีย์ผสมได้ ที่ระยะเวลาหมัก 6 วันเป็นต้นไป เมื่อพิจารณาการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเพื่อผลิตเอโนไซม์ผสมคือการหมักแข็งโดยใช้กากกะทิจากตลาดเป็นสับสเตรทและระยะเวลาหมักนาน 5 วัน เนื่องจากกากกะทิจากตลาดมีเซลลูโลสมากกว่าโรงงาน

ผลของแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส แอคทิวิตี ที่ได้จากการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดเป็นไปในทำนองเดียวกันกับน้ำตาลรีดิวซ์ คือมีค่าสูงที่สุดที่ระยะเวลาหมัก 5 วันเท่ากับ 0.45 IU/mL, 0.30 IU/mL และ 0.12 FPU/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 โปรไฟล์ของแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส แอคทิวิตี ที่ได้จากการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากตลาด



รูปที่ 4.17 โปรไฟล์ของแมนแนนเนส ไคแลนเนส และเซลลูเลส แอคทิวิตี้ ที่ได้จากการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน

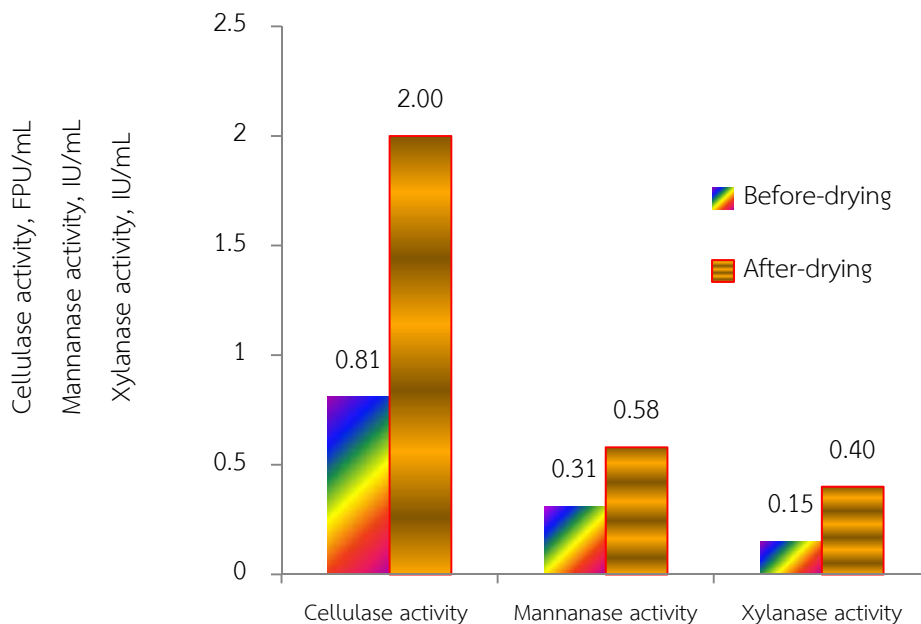
ผลของแมนแนนเนส ไคแลนเนส และเซลลูเลส แอคทิวิตี้ ที่ได้จากการหมักแข็งกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน พบว่า มีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลาหมัก 6 วัน เท่ากับ 0.45 Unit / ml, 0.25 Unit / ml และ 0.10 FPU / ml ตามลำดับ

ดังนั้นกากกะทิจากตลาดสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ผสมได้แก่ แมนแนนเนส ไคแลนเนส และเซลลูเลส โดยผ่านกระบวนการหมักแข็งด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ระหว่างไดโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส สิริวิชี RT-P2 ได้ดีกว่ากากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน เพราะใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่า 1 วัน และผลกิจกรรมของเอนไซม์ผสมยักเว้นกิจกรรมแมนแนนเนสของการใช้กากกะทิจากตลาดมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากกากกะทิจากตลาดมีเซลลูโลสมากกว่า และมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยมวลและปริมาตรน้อยกว่าทำให้จุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายสับสเตรทนี้ได้ดีกว่า ที่ระยะเวลาหมักตั้งแต่ 2 ถึง 5 วัน จุลินทรีย์ผสมเติบโตในกากกะทิได้ดีมากกว่าในกากเนื้อมะพร้าว (รูปที่ 4.14) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีค่ามากกว่า อย่างไรก็ตาม ค่าของกิจกรรมแมนแนนเนสของการใช้กากกะทิและกากเนื้อมะพร้าวมีค่าเท่ากัน อาจเกิดจากในกากกะทิและกากเนื้อมะพร้าวมีแมนโนสซึ่งเป็นองค์ประกอบในสายโซ่เซลลูโลสที่จุลินทรีย์ผสมสามารถย่อยสลายได้พอๆ กัน

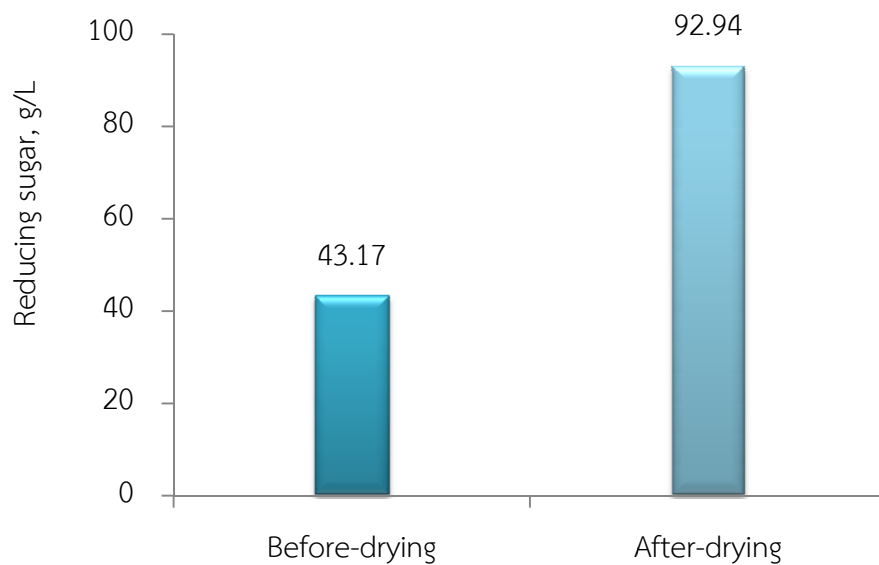
#### 4.3 ผลการผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3

การผลิตผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เริ่มจากกระบวนการหมักแข็งกากกะทิจากตลาดที่สภาวะเหมาะสมในกล่องพลาสติกใสขนาดกลางปิดด้วยผ้าเจาะรูและบ่มในตูบ่มต้นแบบโดยควบคุมอุณหภูมิที่  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  อัตราส่วนของการหมักแข็งคือกากกะทิต่ออาหารเหลว เท่ากับ 1 : 3 (น้ำหนัก: ปริมาตร) ที่พีเอชเท่ากับ 5 การผลิตต่อกล่องใช้กากกะทิเท่ากับ 250 g ในหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ  $7.50 \times 10^4$  spore/mL (จุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเลี้ยงฟัดีเอ 3 จาน) ในอาหารเหลวเท่ากับ 750 ml การผลิตผงเอนไซม์ผสมจะใช้ 6 กล่องต่อครั้ง นั่นคือ ผลิตภัณฑ์สดที่ผลิตได้คือเอนไซม์ผสม RT-P3 ที่ยังสด มีน้ำหนักประมาณ 7 kg ต่อการผลิต โดยความชื้นเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์สดประมาณร้อยละ 72.62 โดยน้ำหนัก ก่อนการนำไปอบแห้งในตูบ่มต้นแบบ เมื่อเอนไซม์ผสมสดนี้ได้ผ่านกระบวนการอบแห้งแล้ว จะได้ผงเอนไซม์ผสมซึ่งมีน้ำหนักแห้งประมาณ 2 กิโลกรัม ที่ความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก

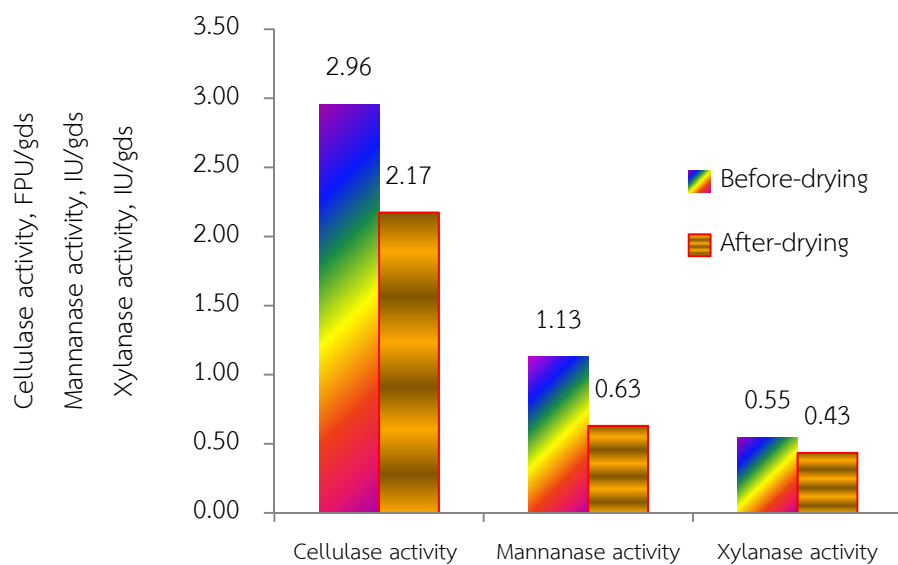
จากการทดลอง พบว่า กิจกรรมเซลลูโลส แมนแนนเนส ไฮแลนเนส และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมหลังการอบแห้งมีค่ามากกว่าก่อนการอบแห้ง ดังรูปที่ 4.18 และรูปที่ 4.19 ตามลำดับ เนื่องจากตัวอย่างก่อนการอบแห้งไปหาความเข้มข้นต่างๆ ใช้ 1 กรัม น้ำหนักเปียก และหลังการอบแห้งใช้น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม น้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.18 กิจกรรมของเซลลูโลส แมนแนนเนส และไฮแลนเนสของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง



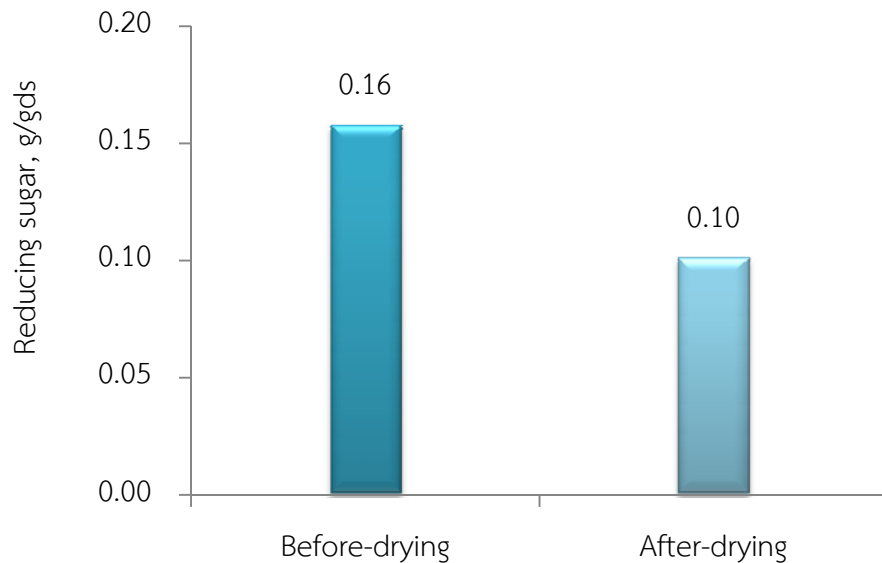
รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง



รูปที่ 4.20 กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง คำนวณบนพื้นฐานของ 1 กรัมน้ำหนักแห้งสับสเตรท (Gram dried substrate, gds)

เปรียบเทียบกิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส ไซแลนเนส และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมระหว่างก่อนและหลังการอบแห้ง จึงต้องคำนวณบนพื้นฐานของ 1 กรัมน้ำหนักแห้งสับสเตรท (Gram dried substrate, gds) โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 สดมีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 72.62 โดยน้ำหนัก ความชื้นสุดท้ายของครูด

เอนไซม์ผสม RT-P3 มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก ผลจากการคำนวณกิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส ไซแลนเนส และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมระหว่างก่อนและหลังการอบแห้งในหน่วยเอนไซม์ต่อกรัมน้ำหนัก (FPU/gds หรือ IU/gds) และน้ำตาลรีดิวซ์ในหน่วยกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งสับสเตรท พบว่า หลังการอบแห้งกิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส ไซแลนเนส และน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสม RT-P3 มีค่าลดลงประมาณร้อยละ 27, 44, 22 และ 38 ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.20 และ 4.21 ตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์ผสมถูกทำลายด้วยอุณหภูมิของการอบแห้ง



รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของเอนไซม์ผสมก่อนและหลังการอบแห้ง คำนวณบนพื้นฐานของ 1 กรัม น้ำหนักแห้งสับสเตรท (Gram dried substrate, gds)

การอบแห้งเอนไซม์ผสมสดจากการหมักกากกะทิในตู้อบแห้งต้นแบบที่ได้จากงานวิจัยปี พ.ศ. 2554 ได้ทำการทดลอง 3 ครั้ง แต่ผลการทดลองใช้เอนไซม์ผสมสดหนัก 7 kg ความชื้นเริ่มต้นประมาณร้อยละ 78 โดยน้ำหนัก อบแห้งที่อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 65°C เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ผลลัพธ์ที่ได้คือผงครูดเอนไซม์ผสมหนัก 2 kg ที่ความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก พลังงานไฟฟ้าที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 6.40 หน่วย (kW.h) ดังตารางที่ 4.6, 4.7 และรูปที่ 4.22 ตามลำดับ

ผลิตภัณฑ์ว่า “ผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3” เนื่องจากเป็นสารผสมในรูปของผงแห้ง ประกอบด้วยจุลินทรีย์ผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีซีอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส ซีรีวีซีอี RT-P2 ซึ่งจะปลดปล่อยเอนไซม์เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในแหล่งอาหารที่เหมาะสม ผสมอยู่ในกากกะทิ

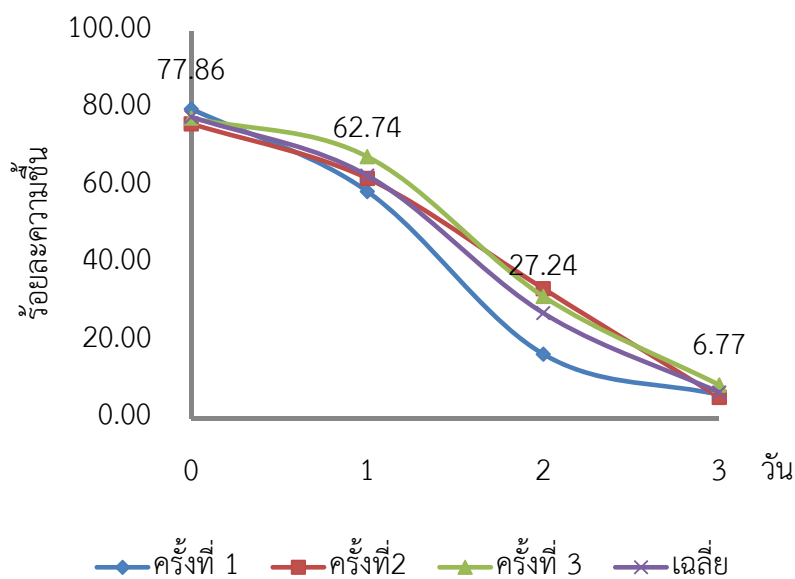
ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานของการผลิตเอนไซม์ผสมจากกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมใช้ข้อมูลค่าใช้จ่ายวัตถุดิบและค่าไฟฟ้า (3.50 บาท/หน่วย) จากงานวิจัยปี พ.ศ. 2554 [51] สำหรับการผลิตครูดเอนไซม์ปริมาณ 1 กิโลกรัม คำนวณค่าใช้จ่ายวัตถุดิบและการดำเนินงานได้เท่ากับ 82.51 บาท ดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ร้อยละความชื้นของเอนไซม์ผสมจากกากกะทิระหว่างการอบแห้ง

| ระยะเวลา | ร้อยละความชื้นของเอนไซม์ผสม |               |               |        |
|----------|-----------------------------|---------------|---------------|--------|
|          | การทดลองที่ 1               | การทดลองที่ 2 | การทดลองที่ 3 | เฉลี่ย |
| เริ่มต้น | 79.92                       | 76.09         | 77.57         | 77.86  |
| 1        | 58.62                       | 62.01         | 67.61         | 62.74  |
| 2        | 16.62                       | 33.54         | 31.55         | 27.24  |
| 3        | 6.14                        | 5.49          | 8.67          | 6.77   |

ตารางที่ 4.7 พลังงานไฟฟ้าและค่าใช้จ่ายในการอบแห้งแต่ละการทดลอง

| วันที่ | พลังงานที่ใช้ (kW·h) |               |               |        |
|--------|----------------------|---------------|---------------|--------|
|        | การทดลองที่ 1        | การทดลองที่ 2 | การทดลองที่ 3 | เฉลี่ย |
| 0      | 2.55                 | 1.55          | 1.55          | 1.85   |
| 1      | 1.50                 | 1.50          | 1.50          | 1.50   |
| 2      | 1.50                 | 1.50          | 1.50          | 1.50   |
| 3      | 1.65                 | 1.50          | 1.50          | 1.55   |
| รวม    | 7.20                 | 6.00          | 6.00          | 6.40   |



รูปที่ 4.22 โปรไฟล์ร้อยละความชื้นของเอนไซม์ผสมระหว่างการอบแห้ง

ตารางที่ 4.8 ค่าใช้จ่ายวัตถุดิบและสารเคมีของหมักแข็งกากกะทิในตูบ่มต้นแบบ

| ลำดับ                                        | รายการ                       | ราคาต่อหน่วย    | ปริมาณที่ใช้ | เป็นเงิน (บาท) |
|----------------------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------|----------------|
| 1                                            | กากกะทิ                      | 2 บาท/กิโลกรัม  | 5 กิโลกรัม   | 10.00          |
| 2                                            | แคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 น้ำ | 8 บาท/กรัม      | 5 กรัม       | 40.00          |
| 3                                            | แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ       | 1.4 บาท/กรัม    | 5 กรัม       | 7.00           |
| 4                                            | ปุ๋ยยูเรีย                   | 0.02 บาท/กรัม   | 40 กรัม      | 0.80           |
| 5                                            | ปุ๋ยฟอสเฟต                   | 0.09 บาท/กรัม   | 75 กรัม      | 6.75           |
| 6                                            | น้ำตาลมะพร้าว                | 0.06 บาท/กรัม   | 150 กรัม     | 9.00           |
| 7                                            | กรดซิตริก                    | 0.58 บาท/กรัม   | 2 กรัม       | 1.16           |
| 8                                            | อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ       | 5.7 บาท/กรัม    | 14.63 กรัม   | 83.36          |
| 9                                            | น้ำอาร์โอ                    | 0.4 บาท/ลิตร    | 20 ลิตร      | 8.00           |
| 10                                           | อื่นๆ                        | 10 บาท/กิโลกรัม | 5 กิโลกรัม   | 50.00          |
| รวมเป็นเงินทั้งสิ้น (บาท/กากกะทิ 5 กิโลกรัม) |                              |                 |              | 216.07         |
| รวมเป็นเงินทั้งสิ้น (บาท/กากกะทิ 1 กิโลกรัม) |                              |                 |              | 43.21          |

ตารางที่ 4.9 ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานของการหมักแข็งกากกะทิในตูบ่มต้นแบบ

| ลำดับ                           | อุปกรณ์              | กำลังไฟฟ้า<br>(กิโลวัตต์) | เวลาที่ใช้ในการ<br>ดำเนินงาน<br>(ชั่วโมง) | หน่วยไฟฟ้า<br>(kW.h) | เป็นเงิน<br>(บาท) |
|---------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------------------|----------------------|-------------------|
| 1                               | ตู้แช่แข็ง           | 2.2                       | 1                                         | 2.2                  | 7.70              |
| 2                               | หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | 2.2                       | 1                                         | 2.2                  | 7.70              |
| 3                               | เครื่องกวนแม่เหล็ก   | 1.03                      | ½                                         | 0.51                 | 1.79              |
| 4                               | เครื่องบดมูลเห็ด     | 0.50                      | 3                                         | 1.50                 | 5.25              |
| 5                               | เครื่องบดกากกะทิ     | 1.65                      | 0.08                                      | 0.13                 | 0.46              |
| 6                               | ตูบ่มต้นแบบ          | 0.3                       | 144                                       | 43.2                 | 151.2             |
| 7                               | เครื่องอบแห้งต้นแบบ  | -                         | -                                         | 6.40                 | 22.4              |
| รวมทั้งสิ้น (บาทต่อ 5 กิโลกรัม) |                      |                           |                                           |                      | 196.5             |
| รวมทั้งสิ้น (บาทต่อ 1 กิโลกรัม) |                      |                           |                                           |                      | 39.3              |

#### 4.4 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบกะจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล

ผลของความเข้มข้นเอทานอลที่ได้ที่สภาวะต่างๆ ดังตารางที่ 4.10 เมื่อนำความเข้มข้นของเอทานอลไปคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล ดังตารางที่ 4.11 พบว่าสภาวะที่ทำให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลมากที่สุดคือน้ำหนักกากกะทิเท่ากับร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ผงครูดเอนไซม์ผสมเท่ากับร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลปีปในอาหารเหลวเท่ากับร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาหมักนาน 10 วัน

ตารางที่ 4.10 ผลของเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวจากกะทิด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 1)

| ลำดับที่ | ตัวแปรอิสระ |                  |            |                  | ความเข้มข้นเอทานอล<br>(กรัมต่อลิตร) |
|----------|-------------|------------------|------------|------------------|-------------------------------------|
|          | กากกะทิ (g) | ผงเอนไซม์ผสม (g) | น้ำตาล (g) | เวลาที่ใช้ (วัน) |                                     |
| 1        | 4           | 3                | 2          | 6                | 46.76                               |
| 2        | 8           | 1                | 2          | 6                | 54.19                               |
| 3        | 8           | 3                | 0          | 6                | 59.73                               |
| 4        | 8           | 3                | 2          | 2                | 64.73                               |
| 5        | 8           | 3                | 2          | 6                | 70.00                               |
| 6        | 12          | 3                | 2          | 6                | 64.59                               |
| 7        | 8           | 5                | 2          | 6                | 59.73                               |
| 8        | 8           | 3                | 4          | 6                | 50.95                               |
| 9        | 8           | 3                | 4          | 10               | 68.78                               |
| 10       | 8           | 3                | 2          | 6                | 50.41                               |
| 11       | 6           | 2                | 1          | 4                | 37.70                               |
| 12       | 6           | 2                | 1          | 8                | 31.08                               |
| 13       | 6           | 2                | 3          | 4                | 64.19                               |
| 14       | 6           | 2                | 3          | 8                | 49.46                               |
| 15       | 8           | 3                | 2          | 6                | 49.46                               |
| 16       | 6           | 4                | 3          | 8                | 76.89                               |
| 17       | 6           | 4                | 3          | 4                | 70.81                               |
| 18       | 6           | 4                | 1          | 4                | 60.95                               |

ตารางที่ 4.10 (ต่อ) ผลของเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวกากกะทิด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 1)

| ลำดับ<br>ที่ | ตัวแปรอิสระ |                  |            |                  | ความเข้มข้นเอทานอล<br>(กรัมต่อลิตร) |
|--------------|-------------|------------------|------------|------------------|-------------------------------------|
|              | กากกะทิ (g) | ผงเอนไซม์ผสม (g) | น้ำตาล (g) | เวลาที่ใช้ (วัน) |                                     |
| 19           | 6           | 4                | 1          | 8                | 75.14                               |
| 20           | 10          | 4                | 3          | 8                | 74.86                               |
| 21           | 10          | 4                | 3          | 4                | 61.89                               |
| 22           | 10          | 4                | 1          | 4                | 56.89                               |
| 23           | 10          | 4                | 1          | 8                | 85.14                               |
| 24           | 10          | 2                | 1          | 4                | 46.62                               |
| 25           | 10          | 2                | 1          | 8                | 61.35                               |
| 26           | 10          | 2                | 3          | 4                | 58.38                               |
| 27           | 10          | 2                | 3          | 8                | 62.43                               |

ตารางที่ 4.11 ผลการคำนวณความเข้มข้นเอทานอลที่สภาวะต่างๆ ของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 1)

|                 |       |       |       |              |              |     |
|-----------------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-----|
| กากกะทิ (g)     | 4     | 6     | 8     | 10           | <b>12</b>    | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 46.76 | 58.28 | 58.66 | 63.45        | <b>64.59</b> | g/L |
| ครูดเอนไซม์ (g) | 1     | 2     | 3     | <b>4</b>     | 5            | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 54.19 | 51.40 | 58.38 | <b>70.32</b> | 59.73        | g/L |
| น้ำตาล (g)      | 0     | 1     | 2     | <b>3</b>     | 4            | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 59.73 | 56.86 | 57.48 | <b>64.86</b> | 59.87        | g/L |
| เวลา (วัน)      | 2     | 4     | 6     | 8            | <b>10</b>    | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 64.73 | 57.18 | 56.20 | 64.54        | <b>68.78</b> | g/L |

ผลการทดลองที่ 1 สภาวะที่ได้ยังไม่เหมาะสมเพราะกากกะทิที่ใช้เป็นน้ำหนัที่กำหนดในขอบเขตสูงสุด นั่นคือถ้าใช้กากกะทิเป็นสับสเตรทมากขึ้น เอทานอลที่ได้ก็จะมีค่ามากตามไปด้วย และการใช้กากกะทिर้อยละ 12 มีขีดจำกัดในการหมักกึ่งเหลวเอทานอลจากกากกะทิเพราะกากกะทิดูดอาหารเหลวทำให้ปริมาตรของเหลวลดลง และกากกะทิพองขึ้น การเก็บของเหลวตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอทานอลทำได้ยาก นั่นคือ การหมักเอทานอลโดยใช้กากกะทिर้อยละ 12 เข้าใกล้การหมักแข็ง

ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ออกแบบขอบเขตของการทดลองใหม่ที่น้ำหนักกากกะทิน้อยกว่าร้อยละ 12 ด้วยการแปรผันกากกะทิเป็นร้อยละ 10, 8, 6 และ 4 โดยน้ำหนัก ผงเอนไซม์ผสมเป็นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนัก และระยะเวลาที่ใช้หมักเท่ากับ 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน ตามลำดับ ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL คงที่ ผลการทดลองดังตารางที่ 4.12 และผลการคำนวณดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.12 ผลของเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวกากกะทิด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวปริมาตร 100 mL วิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 2 และ 3)

| ลำดับ<br>ที่ | กากกะทิ (g) | เอนไซม์ผสม (g) | น้ำตาล (g) | เวลา (วัน) | เอทานอล (g/L) |            |        |
|--------------|-------------|----------------|------------|------------|---------------|------------|--------|
|              |             |                |            |            | ครั้งที่ 1    | ครั้งที่ 2 | เฉลี่ย |
| 1            | 2           | 1              | 0          | 1          | 12.16         | 20.16      | 16.16  |
| 2            | 4           | 1              | 1          | 3          | 42.26         | 48.63      | 45.45  |
| 3            | 6           | 1              | 2          | 5          | 83.82         | 80.11      | 81.97  |
| 4            | 8           | 1              | 3          | 7          | 65.88         | 160.04     | 112.96 |
| 5            | 10          | 1              | 4          | 9          | 86.47         | 65.96      | 76.22  |
| 6            | 2           | 2              | 4          | 9          | 38.73         | 69.67      | 54.20  |
| 7            | 4           | 2              | 0          | 1          | 25.09         | 45.54      | 35.32  |
| 8            | 6           | 2              | 1          | 3          | 72.15         | 58.98      | 65.57  |
| 9            | 8           | 2              | 2          | 5          | 96.64         | 100.09     | 98.37  |
| 10           | 10          | 2              | 3          | 7          | 105.04        | 179.13     | 142.09 |
| 11           | 2           | 3              | 3          | 7          | 87.89         | 178.43     | 133.16 |
| 12           | 4           | 3              | 4          | 9          | 98.59         | 109.37     | 103.98 |
| 13           | 6           | 3              | 0          | 1          | 20.02         | 76.39      | 48.21  |
| 14           | 8           | 3              | 1          | 3          | 60.48         | 111.58     | 86.03  |
| 15           | 10          | 3              | 2          | 5          | 108.13        | 109.02     | 108.58 |
| 16           | 2           | 4              | 2          | 5          | 123.87        | 122.55     | 123.21 |
| 17           | 4           | 4              | 3          | 7          | 100.97        | 204.86     | 152.92 |
| 18           | 6           | 4              | 4          | 9          | 116.89        | 112.38     | 114.64 |
| 19           | 8           | 4              | 0          | 1          | 48.10         | 100.27     | 74.19  |
| 20           | 10          | 4              | 1          | 3          | 99.12         | 123.61     | 111.37 |
| 21           | 2           | 5              | 1          | 3          | 115.47        | 116.36     | 115.92 |
| 22           | 4           | 5              | 2          | 5          | 99.12         | 128.74     | 113.93 |
| 23           | 6           | 5              | 3          | 7          | 95.05         | 201.24     | 148.15 |
| 24           | 8           | 5              | 4          | 9          | 100.00        | 93.72      | 96.86  |
| 25           | 10          | 5              | 0          | 1          | 35.51         | 107.16     | 71.34  |

ตารางที่ 4.13 ผลการคำนวณความเข้มข้นเอทานอลที่สภาวะต่างๆ ของการหมักกึ่งเหลวแบบแบทช์ โดยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล (การทดลองที่ 2 และ 3)

|                 |       |       |        |               |               |     |
|-----------------|-------|-------|--------|---------------|---------------|-----|
| กากกะทิ (g)     | 2     | 4     | 6      | 8             | 10            | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 88.53 | 90.32 | 91.70  | 93.68         | <b>101.92</b> | g/L |
| ครูดเอนไซม์ (g) | 1     | 2     | 3      | <b>4</b>      | 5             | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 66.55 | 79.11 | 95.99  | <b>115.26</b> | 109.24        | g/L |
| น้ำตาล (g)      | 0     | 1     | 2      | <b>3</b>      | 4             | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 49.04 | 84.86 | 105.21 | <b>137.85</b> | 89.18         | g/L |
| เวลา (day)      | 1     | 3     | 5      | <b>7</b>      | 9             | g   |
| เอทานอล (g/L)   | 49.04 | 84.86 | 105.21 | <b>137.85</b> | 89.18         | g/L |

สภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบกะจากการคำนวณ (ตารางที่ 4.13) ด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลคือ กากกะทิร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ผงครูดเอนไซม์ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก น้ำตาลในอาหารเหลวร้อยละ 3 โดยน้ำหนักและระยะเวลาที่ใช้หมัก 7 วัน

#### 4.5 ผลของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะและกึ่งกะจากกากกะทิด้วยเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม

ผลการหมักกึ่งเหลวเอทานอลจากกากกะทิด้วยเอนไซม์ RT-P 3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมแบ่งตามกระบวนการหมัก 2 แบบ คือ

##### 4.5.1 ผลการหมักเอทานอลแบบกะ (Batch)

วิธีทดลองจะทำการขยายขนาดการหมักกึ่งเหลวจากเขย่าขวดปริมาตร 100 mL เป็น 30 เท่า ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตรที่สภาวะเหมาะสม นั่นคือ ใช้น้ำหนักกากกะทิเท่ากับ 300 g ผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 เท่ากับ 120 g และปริมาตรอาหารเหลว (ความเข้มข้นน้ำตาลในร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก) เท่ากับ 3,000 mL แต่เมื่อใช้ส่วนผสมดังกล่าว กากกะทิได้ดูดอาหารเหลว ทำให้ของเหลวในถังหมักจึงลดลง ไม่สามารถเก็บตัวอย่างของเหลววิเคราะห์ผลผลิตได้ จึงเพิ่มปริมาตรหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมเท่ากับ 4500 mL (เพิ่มขึ้นอีกร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก) ที่ pH เท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (30°C) การหมักเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะใช้วิธีการกวนผสมกากกะทิและหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลวด้วยความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาทีประมาณ 6 ถึง 8 ชั่วโมง เดิมอากาศเฉพาะตอนกลางคืนประมาณ 12 ถึง 15 ชั่วโมง

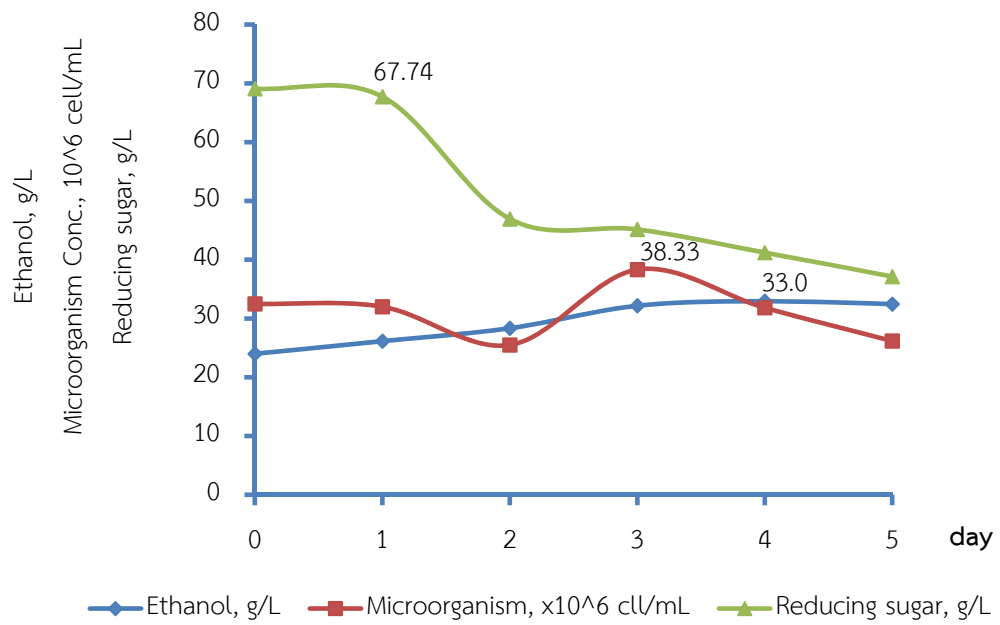
วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอทานอลคือเก็บสารละลายใสที่อยู่ด้านบนเมื่อไม่ได้ทำการกวนผสมและเติมอากาศ อย่างไรก็ตาม ก่อนเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เชื้อจุลินทรีย์ผสมกิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส จะทำการกวนผสมนานประมาณ 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้นาน 30 นาทีให้ตกตะกอน แล้วจึงเก็บตัวอย่างสารแขวนลอยด้านบน

การหมักกึ่งเหลวเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะพบว่า จุลินทรีย์ผสม RT-P3 ใช้เวลาปรับตัว 1 วัน และการเติบโตลดลงที่ระยะเวลาหมักนาน 2 วัน เพราะอาหารหรือแหล่งคาร์บอนลดลงจากการที่น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ผสมมีการเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงสั้นๆ ที่เวลาหมัก 3 วัน หลังจากนั้นการเติบโตลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากน้ำตาลลดลงจากการเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลที่เพิ่มขึ้น เกิดการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ขึ้น ความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์ผสมจึงลดลงตั้งแต่ระยะเวลาหมัก 4 วันขึ้นไป เอทานอลที่ได้มีค่าคงที่ พบว่า เอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุดประมาณ 33 กรัมต่อลิตร ที่เวลาหมักนาน 4 วัน

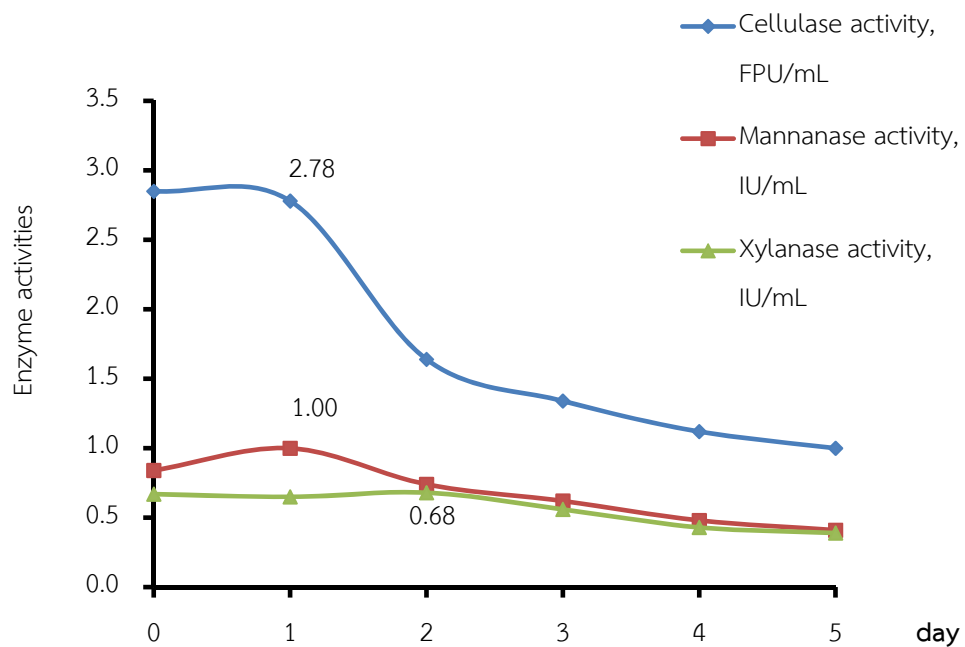
โปรไฟล์กิจกรรมของเซลลูเลส และแมนแนนเนส ของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะนี้มีค่าสูงสุดประมาณ 2.78 FPU/mL และ 1.00 IU/mL ที่ระยะเวลาหมัก 1 วัน และลดต่ำลงอย่างรวดเร็วที่ระยะเวลาหมัก 2 วัน และต่ำลงเล็กน้อยที่ระยะเวลาหมัก 3 วันขึ้นไป ส่วนกิจกรรมของไซแลนเนสมีค่าประมาณ 0.68 IU/mL ที่เวลาหมักนาน 2 วัน อย่างไรก็ตาม กิจกรรมไซแลนเนสมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

ผลของการกวนผสมและการเติมอากาศในระหว่างการหมักทำให้การเติบโตของราใน SmF ไม่สอดคล้องกับธรรมชาติ การเติบโตของเชื้อราจะอยู่บนและภายในสับสเตรทของแข็ง ซึ่งเป็นหลักการเบื้องต้นสัมพันธ์กับการเกาะติดของเซลล์ (adhesion) รูปร่างลักษณะการเติบโตของราเส้นใยเป็นพารามิเตอร์สำคัญสัมพันธ์กับอัตราการผลิตเอโนไซม์ การเติบโตของราเกิดเป็นฟิล์มชีวภาพซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต [47] การกวนผสมและการเติมอากาศในถังหมักในงานวิจัยนี้ อาจจะไปทำลายการเกิดฟิล์มดังกล่าว อัตราการผลิตจึงลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 4.23 และ 4.24 ตามลำดับ

การผลิตเอโนไซม์ผสมต่างๆ จากกากกะทิจึงควรใช้กระบวนการหมักแข็งมากกว่ากระบวนการหมักกึ่งเหลว เพราะได้ผลิตภัณฑ์และเป็นกระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก อย่างไรก็ตาม ควรทำปรับปรุงระบบการหมักกึ่งเหลวเอทานอลจากกากกะทิซึ่งมีของแข็งผสมในอาหารเหลว จึงจำเป็นต้องออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพใหม่ที่เหมาะสม ศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล ได้แก่ เวลาและปริมาณของการเติมอากาศ เวลาและปริมาตรของการเติมอาหารเหลว ที่ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมที่มีอยู่ในถังหมักกะทิ เป็นต้น



รูปที่ 4.23 โปรไฟล์ของเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะ



รูปที่ 4.24 โปรไฟล์กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ของการหมักเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะ

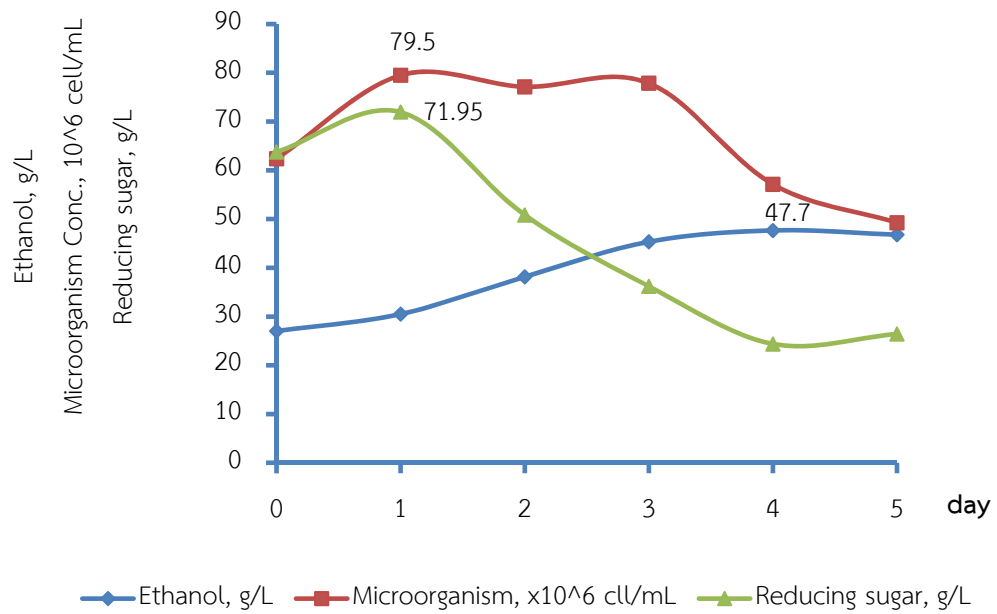
#### 4.5.2 ผลการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะ (Fed-batch)

วิธีการทดลองการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะเหมือนกับแบบกะที่สภาวะเหมาะสม ยกเว้น หลังจากระยะเวลาหมักผ่านไป 1 วัน จะต้องเติมอาหารเหลวใหม่ ปริมาตร 500 มิลลิลิตรลงในถังหมัก ทุกๆ วัน พบว่า เอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุดประมาณ 47.7 กรัมต่อลิตร ที่เวลาหมักนาน 4 วัน โปรไฟล์ กิจกรรมเซลล์ของการหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะที่ได้มีค่าสูงสุดประมาณ 2.75 FPU/mL ที่ ระยะเวลาหมัก 1 วัน และลดต่ำลงอย่างรวดเร็วที่ระยะเวลาหมัก 2 วัน และต่ำลงเล็กน้อยที่ระยะเวลาหมัก 3 วันขึ้นไป ส่วนกิจกรรม แมนแนนเนสและไซแลนเนส มีค่าประมาณ 1.18 IU/mL และ 1.00 IU/mL ที่ระยะเวลาหมัก 1 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 4.25 และ 4.26 ตามลำดับ

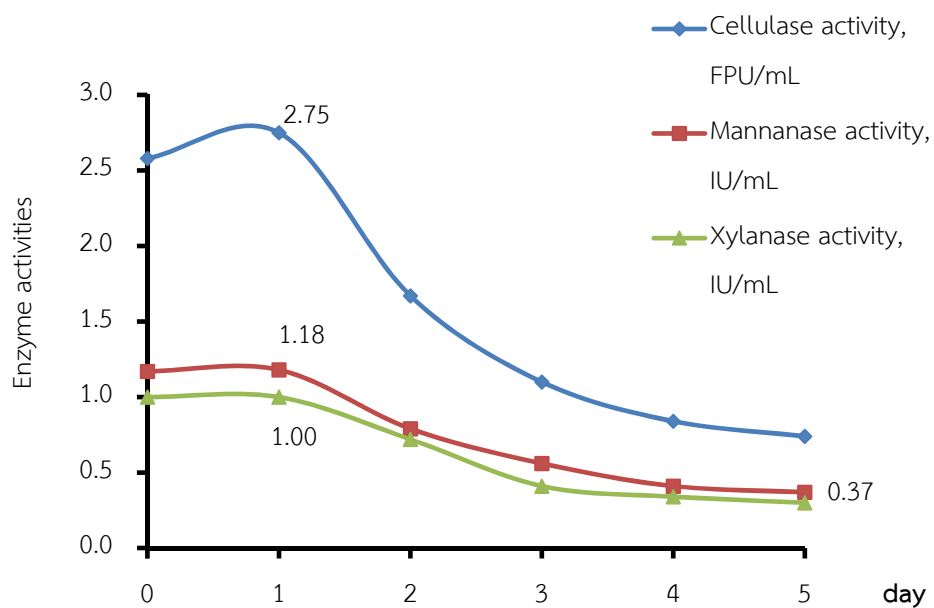
ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวจากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม RT-P3 แบบกึ่งกะ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบกะ คิดเป็นร้อยละ 45 อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นไม่มากนัก เนื่องจาก จุลินทรีย์ผสมสามารถใช้น้ำตาลในอาหารเหลวที่เติมเข้าไปใหม่ได้ทันที จึงเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและใช้ในการเติบโตได้ค่อนข้างคงที่ต่อไปอีก 2 วัน จากนั้นการเติบโตของจุลินทรีย์ผสมจะลดลง เพราะเอทานอลที่ได้มีค่าสูงสุด ซึ่งเอทานอลจะเป็นสารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ผสม และทำให้การย่อยสลายถูกยับยั้งไปด้วย ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงด้วย ดังนั้น การหมักเอทานอลแบบกึ่งกะจึงควรทำการศึกษาในงานวิจัยต่อไป เพื่อหาปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลวที่ต้องการเติมลงในถังหมักร่วมกับการนำผลิตภัณฑ์เอทานอลที่ได้ออกจากถังหมัก ที่ระยะเวลาหมักนาน 4 วัน เพื่อการผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่อง

การหมักเอทานอลกึ่งเหลวทั้งแบบกะและกึ่งกะจะมีเอทานอลเริ่มต้น เพราะในขั้นตอนการหมักแข็งผลิตภัณฑ์ผงครูดเอนไซม์ผสมจะมีเอทานอลเกิดขึ้นด้วย จึงผสมอยู่ในผงที่นำมาใช้ งานวิจัยนี้มีข้อเสนอแนะเพื่องานวิจัยต่อไป ดังนี้

1. การผลิตเอทานอลจากการหมักแข็งวัสดุกลีโนเซลลูโลสด้วยผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3
2. ศึกษาวิธีการสกัดแยกเอทานอลและเอนไซม์ออกจากการหมักแข็งเพื่อผลิตเอทานอล
3. ศึกษาการแยกเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักกึ่งเหลวมาใช้หมุนเวียนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอล
4. ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการปลดปล่อยเอนไซม์ต่างๆ โดยการเพิ่มตัวแปรที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการเกิดเอนไซม์ ได้แก่ ปัจจัยของสับสเตรทผสมต่างๆ ต่อเอนไซม์จากการหมักแข็งวัสดุเซลลูโลสผสม ได้แก่ การผสมของกากกะทิ กากเห็ดหลินจือ กากถั่วเหลือง กากเปลือกตระกูลส้ม และรำข้าว ในอาหารเหลวและผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ที่ได้จากงานวิจัยนี้



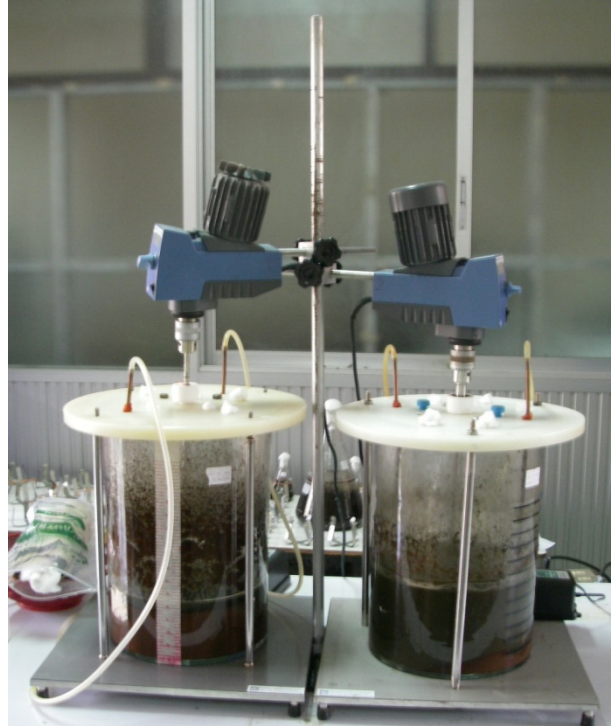
รูปที่ 4.25 โปรไฟล์ของเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมของการหมักกึ่งเหลว เอทานอลแบบกึ่งกะ



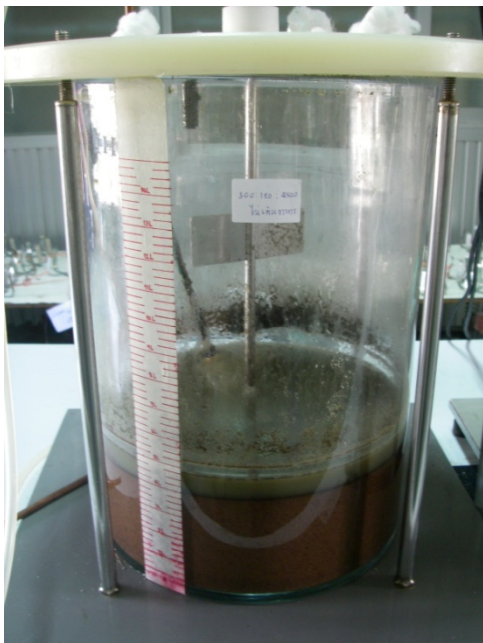
รูปที่ 4.26 โปรไฟล์กิจกรรมของเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ของการหมักกึ่งเหลว เอทานอลแบบกึ่งกะ



(ก)



(ข)



(ค) ไม่เติมอาหาร



(ง) เติมอาหาร

รูปที่ 4.27 การหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะ (ก) และ (ค) และกึ่งกะ (ข) และ (ง) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตรที่สภาวะเหมาะสม