

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

กระบวนการหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยาสองขั้นตอนจากกากผลไม้เหลือทิ้งอุตสาหกรรมเกษตรโดยใช้เอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเดี่ยว งานวิจัยนี้เลือกวัตถุดิบเป็นกากกะทิและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงานสกัดน้ำมันมะพร้าว ผลงานวิจัย พบว่า วัตถุดิบทั้งสองแหล่งสามารถนำมาใช้ในการผลิตผงครูดเอนไซม์ผสม RT-P3 ด้วยจุลินทรีย์ผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส สิริวิซิอี RT-P2 เอนไซม์ผสมที่ได้คือแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส เนื่องจากวัตถุดิบมีแมนโนส ไซโลส และกลูโคสเป็นองค์ประกอบสรุปผลได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้

5.1 วัตถุดิบ

งานวิจัยนี้ใช้วัตถุดิบจาก 2 แหล่ง คือ กากกะทิจากตลาด (CCNR-M) และ กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน (CCNR-F) วัตถุดิบนี้ใช้เป็นแหล่งอาหารที่เรียกว่า แหล่งคาร์บอน เนื่องจากมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนลิกนินซึ่งปะปนอยู่ในวัตถุดิบทั้งสองเป็นตัวขัดขวางการย่อยสลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ ในงานวิจัยนี้จะใช้แหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในวัตถุดิบโดยไม่ได้ทำการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อแยกลิกนินออกก่อน วัตถุดิบดังกล่าวมีสมบัติทางกายภาพและเคมี สรุปได้ดังนี้

- เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของกากกะทิจากตลาดมีค่าต่ำกว่ากากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน ร้อยละประมาณ 15 และ 6 โดยมวลและปริมาตร ดังตารางที่ 5.1 ขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าจะมีพื้นที่สัมผัสมากกว่า จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายสับสเตรทได้ดีกว่า

ตารางที่ 5.1 เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของอนุภาคกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน

สับสเตรท	เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย		เล็กกว่าร้อยละ
	โดยมวล	โดยปริมาตร	
กากกะทิจากตลาด	1.94	2.23	15
กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	2.29	2.42	6

- เซลลูโลสของกากกะทิจากตลาดมีค่ามากกว่าจากโรงงานประมาณร้อยละ 8.24 โดยน้ำหนัก ขณะที่ค่าเฮมิเซลลูโลส ไขมันและเถ้าน้อยกว่าประมาณร้อยละ 3.18, 3.04 และ 1.13 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ กากกะทิจากตลาดจึงเป็นสับสเตรทในการนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ผสมได้ดีกว่าจากโรงงาน

5.2 สภาพที่เหมาะสมสำหรับการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสม

- สารเคมีต่างๆ ในอาหารเหลวใช้เป็นแหล่งอาหารเพิ่มเติม อาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย ไนโตรเจนจากปุ๋ยยูเรีย 8 กรัม โปแตสเซียมและฟอสฟอรัสจากปุ๋ยฟอสเฟต 15 กรัม แคลเซียมและแมกนีเซียมซึ่งเป็นสารจำเป็นอย่างละ 1 กรัม (ผ่องศรี และคณะ, 2552)
- ปริมาตรอาหารเหลวใช้เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็ง ปริมาณน้ำอิสระในการหมักแข็งเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่ง ถ้าความชื้นเริ่มต้นมากเกินไปจะทำให้อากาศแพร่เข้าไปได้ยากขึ้นเพราะไปลดความเป็นรูพรุนลง ถ้าความชื้นน้อยเกินไปจะส่งผลให้การเติบโตของจุลินทรีย์ผสมลดลงเพราะไม่สามารถใช้สารอาหารได้ สภาพที่เหมาะสมของการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสอี RT-P1 และแซคคาโรมายซิส สิริวิชี RT-P2 ในอาหารเหลวที่พีเอช 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นของจุลินทรีย์ผสมประมาณ 7.07×10^5 spore/mL ที่อุณหภูมิ $24 \pm 2^\circ\text{C}$ คือ กากกะทิ:อาหารเหลว เท่ากับ 1:3 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ซึ่งมีช่วงความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ประมาณร้อยละ 72-78 โดยน้ำหนัก
- พีเอชที่เหมาะสมของการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมคือ pH 5 เพราะเป็นพีเอชที่เชื้อราเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะธรรมชาติ ราสัณส์ที่ผิวของสับสเตรทเพื่อใช้สารอาหาร แล้วจึงปลดปล่อยเอนไซม์ และยอคไฮฟีเติบโตได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องใช้น้ำอิสระ [47]
- เนื่องจากความชื้นเริ่มต้นของการหมักแข็งมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักแข็งให้มีค่าค่อนข้างคงที่ ดังนั้น การหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลวที่พีเอช 5 ต้องการความชื้นเริ่มต้นประมาณร้อยละ 72-78 โดยน้ำหนักจึงต้องบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ $24 \pm 2^\circ\text{C}$ เพราะถ้าอุณหภูมิไม่คงที่ความชื้นของระบบอาจจะลดลงหรือเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงความชื้นของระบบทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมเติบโตได้ไม่ดี การปลดปล่อยเอนไซม์ลดลงหรือกิจกรรมเอนไซม์มีค่าไม่สม่ำเสมอ
- การหมักแข็งกากกะทิในอาหารเหลวด้วยจุลินทรีย์ผสม จึงควรใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ หรือโปเตโต เด็กซ์โทส เอการ์ เพราะที่ระยะเวลาหมักนาน 6 วัน ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมจากจานเพาะเลี้ยงมีค่าประมาณ 4.27×10^7 spore/mL ส่วนจุลินทรีย์ผสมในซามแก้วที่ระยะเวลาหมักเท่ากันมีค่าประมาณ 2.95×10^7 spore/mL ทำให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ของการใช้หัวเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงน้ำตาล มีค่ามากกว่า คิดเป็นร้อยละประมาณ 48, 7, 10 และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังตารางที่ 5.2
- การใช้กากกะทิจากตลาดเป็นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนจะให้ผลการผลิตเอนไซม์ผสมได้ดีกว่ากากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน เนื่องจากจุลินทรีย์ผสมเติบโตได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะเวลามากกว่า 2 วันขึ้นไป และมีค่าสูงสุดที่ 7 วัน ประมาณ 1.30×10^7 spore/mL ทำให้สามารถย่อยสลายเซลลูโลส จึงทำให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมแมนแนนเนส, กิจกรรมไซแลนเนส และกิจกรรมเซลลูเลส สูงสุดเท่ากับ 25.62 g/L, 0.45, 0.30 IU/mL และ 0.12 FPU/mL ตามลำดับ ที่ระยะเวลาหมัก

นาน 5 วัน ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าการใช้กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน 1 วัน และมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ร้อยละ 32 กิจกรรมไซแลนเนส และกิจกรรมเซลลูเลสมีการเพิ่มขึ้นเท่ากันเท่ากับร้อยละ 17 ส่วนกิจกรรม แมนแนนเนส มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ดังตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.2 ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมแมนแนนเนส ไซแลนเนส และเซลลูเลส ของการหมักแข็ง กากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากงานฟิตีเอและซามแก้ว ระยะเวลาหมัก 6 วัน

ผล	หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจาก		มากกว่าร้อยละ
	งานฟิตีเอ	ซามแก้ว	
น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	38.80	20.37	48
กิจกรรมแมนแนนเนส (IU/mL)	0.45	0.42	7
กิจกรรมไซแลนเนส (IU/mL)	0.21	0.19	10
กิจกรรมเซลลูเลส (FPU/mL)	0.98	0.96	2

ตารางที่ 5.3 ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมแมนแนนเนส ไซแลนเนส เซลลูเลส และระยะเวลาหมักของ การหมักแข็งกากกะทิจากตลาดและกากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน

ผล	กากกะทิจากตลาด	กากเนื้อมะพร้าวจากโรงงาน	เพิ่มขึ้นร้อยละ
น้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	25.62	17.50	32
กิจกรรมแมนแนนเนส (IU/mL)	0.45	0.45	0
กิจกรรมไซแลนเนส (IU/mL)	0.30	0.25	17
กิจกรรมเซลลูเลส (FPU/mL)	0.12	0.10	17
ระยะเวลาหมัก (วัน)	5	6	-

5.3 การผลิตผงเอนไซม์ผสม 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 ในหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 7.50×10^4 spore/mL (จุลินทรีย์ผสมจากงานเพาะเลี้ยงฟิตีเอ 3 จาน) ในอาหารเหลวเท่ากับ 750 ml การผลิตผงเอนไซม์ผสมจะใช้ 6 กล่องต่อครั้ง นั่นคือ ผลิตภัณฑ์สดที่ผลิตได้คือเอนไซม์ผสมที่ยังสด มีน้ำหนักประมาณ 7 kg ต่อการผลิต โดยความชื้นเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์สดประมาณร้อยละ 77.86 โดยน้ำหนัก ก่อนการนำไปอบแห้งในตูบ่มต้นแบบ เมื่อเอนไซม์ผสมสดนี้ได้ผ่านกระบวนการอบแห้งแล้ว จะได้ผงเอนไซม์ผสมซึ่งมีน้ำหนักแห้งประมาณ 2 กิโลกรัม ที่ความชื้นสุดท้ายประมาณร้อยละ 6.77 โดยน้ำหนัก ผลความเข้มข้นของจุลินทรีย์และน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนสของเอนไซม์ผสมแห้งมีค่าน้อยกว่าสดเนื่องจากความร้อนในการอบแห้งประมาณ $60-65^{\circ}\text{C}$ ได้ทำลายสมบัติต่างๆ ดังกล่าวลง ดังตารางที่ 5.4 อย่างไรก็ตาม ร้อยละการลดลงเฉลี่ยร้อยละ 33 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยอมรับได้ เนื่องจากผงเอนไซม์ผสมมีอายุการใช้งานนานกว่าเอนไซม์ผสมสดถึงแม้จะมีสมบัติต่างๆ ต่ำกว่าแต่ต้องนำไปใช้ทันที ส่วนผงเอนไซม์ผสมมีอายุการใช้งานนาน 4-6 เดือน

ตารางที่ 5.4 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ผสมและน้ำตาลรีดิวซ์ กิจกรรมเซลลูเลส แมนแนนเนส และไซแลนเนส ก่อนและหลังการอบแห้ง

ผล	เอนไซม์ผสม		ลดลงร้อยละ
	สด	แห้ง	
ความเข้มข้นจุลินทรีย์ผสม (spore/mL)	1.42×10^7	9.41×10^6	34
ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (g/gds)	0.16	0.10	38
กิจกรรมเซลลูเลส (FPU/gds)	2.96	2.17	27
กิจกรรมแมนแนนเนส (IU/gds)	1.13	0.63	44
กิจกรรมไซแลนเนส (IU/gds)	0.55	0.43	22

5.4 การใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอนหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักกึ่งเหลวแบบกะจากกากกะทิด้วยผงเอนไซม์ผสม CCNR-RT-P3 เพื่อผลิตเอทานอล

สภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะในระดับเขย่าขวดปริมาตร 100 mL จากการคำนวณด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอน คือ กากกะทिर้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ผงครูดเอนไซม์ ร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก น้ำตาลในอาหารเหลวร้อยละ 3 โดยน้ำหนักและระยะเวลาที่ใช้หมัก 7 วัน

5.5 การหมักกึ่งเหลวเอทานอลแบบกะและกึ่งกะจากกากกะทิด้วยเอนไซม์ผสม RT-P3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสม

การหมักเอทานอลกึ่งเหลวแบบกะและกึ่งกะที่สภาวะเหมาะสม คือใช้กากกะทิ 300 g ผงครูดเอนไซม์ผสม 120 g และอาหารเหลว 4500 mL (ความเข้มข้นน้ำตาลร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก) เอทานอลที่ได้จากการหมักแบบกะและกึ่งกะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 33.0 และ 47.7 g/L ที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน

กากกะทิจึงสามารถนำมาผลิตเอทานอลด้วยการหมักกึ่งเหลวโดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมในรูปแบบของผงเอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งกากกะทิด้วยหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมในอาหารเหลว พบว่าการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะผลิตเอทานอลได้มากกว่าแบบกะ ที่ระยะเวลาหมักเท่ากันเท่ากับ 4 วัน การหมักเอทานอลแบบกึ่งกะจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละประมาณ 31 จึงใช้แก้ปัญหาอัตราการผลิตที่ลดต่ำลงเนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอลที่สะสมเพิ่มขึ้นซึ่งสารทั้งสองเป็นตัวยับยั้งในการหมัก

ปัจจัยที่สำคัญของการผลิตเอทานอลกึ่งเหลวคือการเติมอากาศและการกวนผสมสับสเตรทให้เข้ากับหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมและอาหารเหลว พบว่า ไม่สามารถกวนผสมและเติมอากาศในถังหมักอย่างต่อเนื่องได้ เพราะเอทานอลที่เกิดขึ้นระเหยออกไปด้านบนผ่านรูระบายอากาศที่ปิดด้วยสำลี จึงต้องกวนผสมและเติมอากาศเป็นช่วงๆ ประกอบกับการกวนผสมและการเติมอากาศทำลายการเกิดฟิล์มของจุลินทรีย์ อัตราการผลิตเอทานอลและเอนไซม์ต่างๆ จึงลดลง [47]

การเติบโตและปลดปล่อยเอนไซม์ต่างๆ ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 ซึ่งอยู่ในผงครูดเอนไซม์ผสมเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล เชื้อรานี้ต้องการใช้อากาศ ความเหมาะสมของพีเอช 5 คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และสารอาหารจำเป็นอีกเล็กน้อย และอุณหภูมิประมาณ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ อย่างไรก็ตาม ในผงครูดเอนไซม์ผสมยังมีเชื้อยีสต์แซคคาโรมายซิสสิริวิซิอี RT-P2 อยู่ด้วยซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ยีสต์นี้ต้องการอากาศในระหว่างการหมักเอทานอล แต่ใช้อากาศในตอนเริ่มต้นเพื่อการเติบโต ดังนั้น การผลิตเอทานอลโดยใช้ผงครูดเอนไซม์ผสมจึงต้องคำนึงถึงระยะเวลาในการเติมอากาศและการกวนผสมอย่างมีนัยสำคัญ จุดเด่นของผลงานวิจัยนี้

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตผงครูดเอนไซม์ผสมใช้สารเคมีราคาไม่แพง ได้แก่ ปุ๋ยยูเรีย ปุ๋ยฟอสเฟต เป็นแหล่งอาหารเพิ่มเติม
2. ผงครูดเอนไซม์ผสมที่ได้จากการหมักแข็งกากกะทิด้วยจุลินทรีย์ผสม RT-P3 ระหว่างไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 และ แซคคาโรมายซิสสิริวิซิอี RT-P2 สามารถนำไปใช้เพื่อการหมักเอทานอลจากกากกะทิในขั้นตอนเดียวโดยไม่ต้องนำสับสเตรทมาผ่านการปรับสภาพก่อน ถึงแม้จะมีลิกนินผสมปะปนในวัตถุดิบ
3. ผงครูดเอนไซม์ผสมมีอายุการใช้งานนานกว่าเอนไซม์ผสมสด เก็บรักษาไว้ในถุงอะลูมิเนียมเคลือบพลาสติก
4. การนำผงครูดเอนไซม์ผสมไปใช้หมักเอทานอลแบบกึ่งเหลวทำได้ง่าย โดยการผสมผงครูดเอนไซม์ผสมกับอาหารเหลวและนำไปหมักเอทานอลพร้อมๆ กัน