

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ

- 3.1.1.1 กากน้ำตาล จากร้านขายของชำ ต.บ่อทอง อ.หนองจิก จ.ปัตตานี รับมาจากโรงงานผลิตน้ำตาล จ.นครราชสีมา และ จ.ลพบุรี
- 3.1.1.2 เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5195 จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- 3.1.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM agar
- 3.1.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM

3.1.2 อุปกรณ์

- 3.1.2.1 ถังหมักต้นแบบที่ผลิตจากสแตนเลส ขนาด 25 ลิตร
- 3.1.2.2 ชุดใบกวนสำหรับถังหมักต้นแบบ
- 3.1.2.3 มอเตอร์ไฟฟ้า 1 HP (0.75 kW) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น TFO-K
- 3.1.2.4 เครื่องควบคุมความเร็วรอบมอเตอร์ไฟฟ้า 1 HP, 0.75 kW, 220 V ยี่ห้อ Novem Inverter รุ่น NSI-2-001
- 3.1.2.5 เครื่องทำน้ำเย็น (Water Chilling)
- 3.1.2.6 อ่างน้ำร้อน (Water Bath)
- 3.1.2.7 ป้อนสุญญากาศ ยี่ห้อ Lifetech AP 1600 Liquid Filter
- 3.1.2.8 เครื่องเก็บข้อมูลอุณหภูมิ DataLogger
- 3.1.2.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง pH meter ยี่ห้อ Cyberscan 500
- 3.1.2.10 Hand Refractometer 0-32 °Brix ยี่ห้อ ATAGO(Japan)
- 3.1.2.11 เครื่อง Ebulliometer ยี่ห้อ Dujardin-Sallerron 75012 Paris France
- 3.1.2.12 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Matte-Toledo-GMOH รุ่น PG5002-5

3.1.3 สารเคมี

- 3.1.3.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.1.3.2 สารละลายไฮโดรคลอริก
- 3.1.3.3 น้ำกลั่น
- 3.1.3.4 สารฆ่าเชื้อ KMS

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ศึกษาการออกแบบและสร้างถังหมักสำหรับผลิตเอทานอล

รวบรวมข้อมูลสำหรับการออกแบบถังหมักขนาด 25 ลิตร เขียนแบบและสั่งแบบให้ผู้ผลิต และปรับปรุงงานหลักสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมพิจารณาสร้างถัง ติดตั้งอุปกรณ์กวนผสม จัดหาอุปกรณ์อื่นๆ สำหรับการควบคุมสถานะการหมัก

3.2.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล

- 3.2.2.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้โดยใช้ Hand refractometer 0-32 °Brix
- 3.2.2.2 ปริมาณความชื้น (A.O.A.C, 2000)
- 3.2.2.3 ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method (A.O.A.C, 2000)
- 3.2.2.4 ปริมาณเถ้า (A.O.A.C, 2000)
- 3.2.2.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(ดัดแปลงจาก Somogyi, 1951 และสารละลายกลูโคสออกซิเดส)
- 3.2.2.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ดัดแปลงจาก Somogyi, 1951 และสารละลายกลูโคสออกซิเดส)

3.2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักต่อปริมาณเอทานอล ในการหมักแบบกะโดยไม่มีการกวนผสม

- 3.2.2.1 ฆ่าเชื้อถังหมักด้วยการเติมน้ำต้มเดือดอุณหภูมิ 100 °C ในถังเป็นเวลา 30 วินาที แล้วเททิ้ง
- 3.2.2.2 นำกากน้ำตาล 19 ลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาล 20 °Brix pH เท่ากับ 5 ไปต้มให้เดือดอุณหภูมิ 100 °C นาน 5 วินาที แล้วถ่ายลงในถังหมักขณะร้อน ปิดฝาถังแล้วลดอุณหภูมิต่ำ

- 3.2.2.3 เปิดเครื่องทำน้ำเย็นเพื่อหล่อเย็น โดยปรับอุณหภูมิและอัตราการไหลของน้ำหล่อเย็นให้อุณหภูมิของการหมักคงที่เท่ากับ 25 °C ตลอดระยะเวลาการหมัก
- 3.2.2.4 เมื่ออุณหภูมิของน้ำหมักเท่ากับ 25 °C เติมหั่วเชื้อลงในน้ำหมักปริมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร เริ่มจับเวลาที่ 0 ชั่วโมงของการหมัก เก็บตัวอย่างครั้งละ 150 ml ที่เวลา 0, 4, 8, 12, 24 และ 36 ชั่วโมงของการหมัก
- 3.2.2.5 เติมสารฆ่าเชื้อ KMS ลงในตัวอย่างที่เก็บ
- 3.2.2.6 นำตัวอย่างวิเคราะห์หาค่า
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เครื่อง Hand refractometer
 - ค่า pH
 - อุณหภูมิ
 - ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.2.2.1 ถึง 3.2.2.6 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิการหมักจาก 25 °C เป็น 30, 35 และ อุณหภูมิห้อง โดยไม่มีการกวนผสมตามลำดับ

3.2.3 ศึกษาผลของชนิดใบกวนต่อปริมาณเอทานอลในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

โดยใช้อุณหภูมิการหมักที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 3.2.2 กำหนดให้เท่ากับ (Topt °C)

- 3.2.3.1 ฆ่าเชื้อถังหมักด้วยการเติมน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วเททิ้ง
- 3.2.3.2 นำกากน้ำตาล 19 ลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาล 20 °Brix pH เท่ากับ 5 ไปต้มให้เดือด อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 วินาที แล้วถ่ายลงในถังหมักขณะร้อน ปิดฝาถังแล้วลด อุณหภูมิลง
- 3.2.3.3 เปิดเครื่องกวนผสมและระบบหล่อเย็น โดยจะปรับอุณหภูมิและอัตราการไหล ของน้ำหล่อเย็นให้อุณหภูมิของการหมักคงที่เท่ากับ Topt °C ตลอดระยะเวลาการ หมัก และใช้ความเร็วในการกวนผสมเท่ากับ 75 rpm โดยใช้ใบกวนผสมชนิด ใบพัดกังหัน (Turbine)
- 3.2.3.4 เมื่ออุณหภูมิของน้ำหมักเท่ากับ Topt °C เติมหั่วเชื้อลงในน้ำหมักร้อยละ 5 โดย ปริมาตร เริ่มจับเวลาเป็น 0 ชั่วโมงของการหมัก
- 3.2.3.5 เก็บตัวอย่างครั้งละ 150 ml ที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก

3.2.3.6 เมื่อเวลาของการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ก็จะมีการเติมกากน้ำตาลเข้มข้น 40 °Brix ปริมาตร 300 ml ที่เวลา 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก

3.2.3.7 เติมน้ำเชื้อ KMS

3.2.3.8 นำตัวอย่างวิเคราะห์ค่า

- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เครื่อง Hand refractometer
- ค่า pH
- อุณหภูมิ
- ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer
- จำนวนเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายโดยวิธี Plate counting ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar

ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.2.3.1 ถึง 3.2.3.8 โดยเปลี่ยนชนิดของใบกวนผสมเป็นใบกวนผสมชนิดใบพัดกังหันแบบเฉย (Open turbine) และ ใบพัดเรือ (Marine propeller) โดยทำ 2 ซ้ำ

3.2.4 ศึกษาผลของความเร็วใบกวนต่อปริมาณเอทานอลในการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

โดยใช้อุณหภูมิการหมักที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 3.2.2 กำหนดให้เท่ากับ (T_{opt} °C) และชนิดใบกวนที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 3.2.3 กำหนดให้เป็นชนิด A

3.2.4.1 นำเชื้อถึงหมักด้วยการเติมน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 วินาทีแล้วเททิ้ง

3.2.4.2 นำกากน้ำตาล 19 ลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาล 20 °Brix pH เท่ากับ 5 ไปต้มให้เดือดอุณหภูมิ 100 °C นาน 5 วินาที แล้วถ่ายลงในถังหมักขณะร้อน ปิดฝาถังแล้วลดอุณหภูมิตง

3.2.4.3 เปิดเครื่องกวนผสมและระบบหล่อเย็น โดยจะปรับอุณหภูมิและอัตราการไหลของน้ำหล่อเย็นให้อุณหภูมิของการหมักคงที่เท่ากับ T_{opt} °C ตลอดระยะเวลาการหมัก และใช้ความเร็วในการกวนผสมเท่ากับ 0 rpm และใช้ใบกวนชนิด A

3.2.4.4 เมื่ออุณหภูมิของน้ำหมักเท่ากับ T_{opt} °C เติมหักเชื้อลงในน้ำหมักร้อยละ 5 โดยปริมาตร เริ่มจับเวลาเป็น 0 ชั่วโมงของการหมัก

3.2.4.5 เก็บตัวอย่างครั้งละ 150 ml ที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก

3.2.4.6 เมื่อเวลาของการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ก็จะมีการเติมกากน้ำตาลเข้มข้น 40 °Brix ปริมาตร 300 ml ที่เวลา 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก

3.2.4.7 เติมสารฆ่าเชื้อ KMS

3.2.4.8 นำตัวอย่างวิเคราะห์หาค่า

- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เครื่อง Hand refractometer
- ค่า pH
- อุณหภูมิ
- ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Ebulliometer
- จำนวนเชื้อเริ่มต้นและสุดท้ายโดยวิธี Plate counting ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar

ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.2.4.1 ถึง 3.2.4.8 โดยเปลี่ยนชนิดของใบกวนผสมเป็นชนิด Open turbine และ Marine propeller โดยทำ 2 ซ้ำ

3.3 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เพื่อหาผลของปัจจัยที่ศึกษา