บทที่ 3

การทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. การศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดไม่ต่อเนื่องและกึ่งต่อเนื่องในการผลิตเอทานอลจากน้ำสับปะรด ใช้เครื่องหมักตามแบบของวิชาพงษ์ (2525)

2. การศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่อง เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำสับปะรด โดยใช้สภาวะการทดลองที่ได้จากการศึกษาในแบบไม่ต่อเนื่องและกึ่งต่อเนื่อง อุปกรณ์ที่ใช้ต่อกันดังรูปที่ 3-1 มี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ 1) เครื่องพาสเจอร์ไรซ์ และ 2) คอลัมน์สำหรับหมัก

2.1 เครื่องพาสเจอร์ไรซ์

ประกอบด้วยถังเก็บสารอาหารก่อนผ่านการให้ความร้อน ทางด้านล่างของถังต่อเข้ากับท่อสเตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 เซนติเมตร ขดเป็นวงกลมหลาย ๆ ชั้น ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอยู่ในถังสเตนเลสทรงกระบอกบรรจุน้ำ และมีขด heater ให้ความร้อนอยู่ภายในถัง หลักการพาสเจอร์ไรซ์สำหรับเครื่องมือชุดนี้อาศัยน้ำเป็นตัวนำความร้อนจากขด heater ผ่านไปให้สารอาหารที่ไหลผ่านท่อสเตนเลสที่ปลายท่อมีวาล์วปิดเปิดใช้ในการควบคุมการไหลออกของสารอาหาร เพื่อให้สารอาหารได้รับความร้อนสูงถึงอุณหภูมิที่ต้องการ สารอาหารที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วจะถูกเก็บไว้ในถังเก็บ ทิ้งให้เย็นก่อนจะปั๊มเข้าสู่คอลัมน์สำหรับหมัก

2.2 คอลัมน์สำหรับหมัก แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

2.2.1 คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ จำนวน 1 คอลัมน์ รายละเอียดเหมือนข้อ 1. และมีปั๊มช่วยควบคุมการไหลของสารอาหารเข้าสู่คอลัมน์ตรงรูที่ 3 ของฝาปิดตอนบน ด้วยอัตราที่คงที่ ปลายด้านล่างของคอลัมน์มีวาล์วปิดเปิด และมีหัวกระจายอากาศ จะเปิดวาล์วเมื่อเริ่มดำเนินการทดลองในระบบต่อเนื่อง

2.2.2 คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ จำนวน 8 คอลัมน์ แต่ละคอลัมน์ทำด้วย พีวีซี ชนิดแข็ง เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร ที่ฝาปิดตอนบน ดังรูปที่ 3-1 มีรูขนาด 4 เซนติเมตร สำหรับให้ฟองล้น มีท่อต่อเข้าสู่ระบบกำจัดฟองของคอลัมน์ที่มีการให้อากาศและใช้สำหรับเป็นที่ดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ ดึงตัวอย่างโดยจุ่มท่อ พีวีซี ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ความยาวของปลายท่อจะอยู่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของน้ำหมักในคอลัมน์ จะจุ่มท่อเฉพาะตอนดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ สำหรับฝาปิดตอนล่าง มีท่อแยกออกเป็น 2 ทาง ดังรูปที่ 3-1 แต่ละท่อมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตร ทางหนึ่งต่อท่อตรงออกมา มีวาล์วปิดเปิดที่ปลายท่อสำหรับดึงเซลยีสต์และน้ำหมักออกมา ส่วนอีกทางหนึ่งต่อท่อสั้น ๆ ในลักษณะตั้งฉากกับท่อแรก จากนั้นต่อตั้งฉากขนานขึ้นไปกับตัวคอลัมน์ จนถึงระดับความสูง 75 เซนติเมตร แล้วแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งเป็นท่อตรงสำหรับให้ฟองล้นและเป็นทางออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เซลยีสต์ผลิตขึ้น สำหรับอีกทางหนึ่งเป็นท่อต่อในลักษณะตั้งฉากปลายท่อนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตร ต่อเข้ากับคอลัมน์ถัดไป

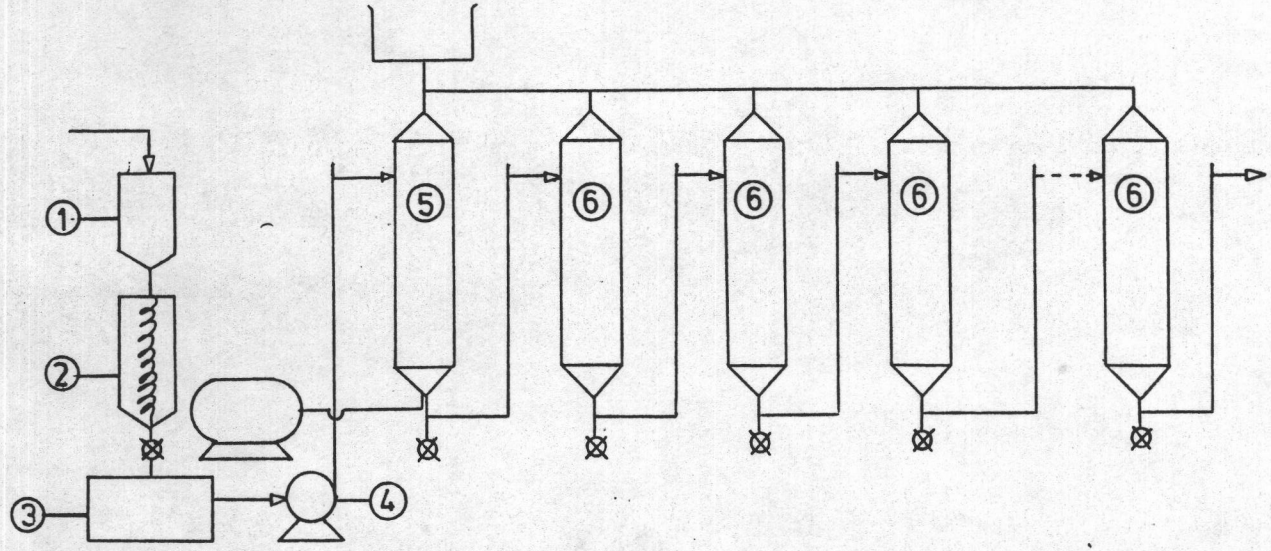
<u>การเตรียมการหมัก</u>

1. ยีสต์

ในการทดลอง ใช้ยีสต์ <u>S. ellipsoideus</u> จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เก็บรักษายีสต์บนอาหาร YM medium ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน ก่อนนำมาใช้จะถ่ายเชื้อใหม่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อต่อไปอีก 2 ครั้ง เพื่อให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตดี

2. น้ำสับปะรด

ใช้สับปะรดสุกที่ผ่านการล้าง ปอกเปลือก และนำเข้าเครื่องบีบ จากนั้นกรองน้ำสับปะรดที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง ปรับความเข้มข้นของน้ำสับปะรดให้มีสารละลายน้ำตาล 18 องศาบริกซ์ (วิชาพงษ์, 2525) ด้วยน้ำตาลทรายขาว ปรับ pH 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)



รูปที่ 3-1 ส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่อง

1. ถังเก็บสารอาหารก่อนผ่านการให้ความร้อน
2. ถังพาสเจอร์ไรซ์
3. ถังเก็บสารอาหารหลังผ่านการให้ความร้อน
4. ปั๊ม
5. คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ
6. คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ

3. เครื่องหมัก

จากอุปกรณ์ข้อ 1. และ ข้อ 2. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ด้วยน้ำยาทีโพล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำปราศจากเชื้อ ตามด้วยน้ำผสมเอทานอลร้อยละ 80 (โดยปริมาตร) (Aiba, 1968)

ที่กรองอากาศ เป็นท่อแก้วบรรจุสำลีที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วอยู่ภายใน (วิชาพงษ์, 2525)

4. เชื้อหมักเริ่มต้น

เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในคอลัมน์ที่ปราศจากเชื้อ ใช้น้ำสับปะรดที่เตรียมไว้แล้วโดยเตรียมในปริมาตรร้อยละ 5 ของปริมาตรน้ำหนักทั้งหมดที่จะทำการหมัก เติมสารอาหารเสริม ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต ร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แอมโมเนียม ซัลเฟต ร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแมกเนเซียม ซัลเฟต ร้อยละ 0.01 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ ทำการถ่ายเชื้อยีสต์ที่กำลังเจริญเติบโตดีลงไป โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ (ใช้ยีสต์จำนวน 10 หลอด) หลังจากนั้นถ่ายลงในคอลัมน์ แล้วให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลยีสต์ในตอนเริ่มต้นให้มีความเข้มข้นประมาณ 400 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร

<u>การทดลองหมัก</u>

เติมน้ำสับปะรดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วมีน้ำตาลเข้มข้น 18 องศาบริกซ์ pH 4.5 พร้อมทั้งเติมอาหารเสริมที่ปราศจากเชื้อแล้วลงไปในคอลัมน์จนได้ปริมาตรครบ 6,000 มิลลิลิตร ให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดอากาศออกจากท่อป้อนย้อนกลับทั้งสาม (รูที่ 4,5,6 รูปที่ 2-2)

ทางวาล์วปิด เปิด แล้วปิดวาล์วทันที กำจัดฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักด้วยอุปกรณ์กำจัดฟอง (หมายเลข 8 รูปที่ 2-1) และปรับ pH ประมาณ 4.5 ตรวจดู pH ทุก 2 ชั่วโมง อุณหภูมิตลอดการทดลอง 30 องศาเซลเซียส

1. ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดไม่ต่อเนื่อง โดยใช้สารอาหาร และสภาวะการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 สภาวะการผลิตเอทานอลในคอลัมน์ชนิดไม่ต่อเนื่อง

สารละลายน้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล	18	องศาบริกซ์
เชื้อ *S. ellipsoideus* เริ่มต้น	400	ล้านเซลต่อมิลลิลิตร
อุณหภูมิ	30-32	องศาเซลเซียส
อัตราการให้อากาศ	0.5	ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที
	4	ชั่วโมง
pH	4.5	
อาหารเสริม ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต ร้อยละ	0.05	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
แอมโมเนียม ซัลเฟต ร้อยละ	0.05	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
แมกเนเซียม ซัลเฟต ร้อยละ	0.01	(น้ำหนักต่อปริมาตร)
เวลาที่ใช้ในการหมักทั้งสิ้น	24	ชั่วโมง

2. ศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง

ใช้สารอาหารและสภาวะการหมักเหมือนข้อ 1. เมื่อผลผลิตเอทานอลสูงถึงร้อยละ 8 (โดยปริมาตร) เริ่มทำการถ่ายเทน้ำหมักร้อยละ 25 ในช่วงเวลาที่กำหนด และทดแทนด้วยสารละลายน้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 องศาบริกซ์ ในอัตราเดียวกัน ปรับ pH 4.5 พร้อมทั้งเติมอาหารเสริม ทำการตรวจสอบปริมาณเอทานอล จำนวนเซลยีสต์ ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ทที่เหลืออยู่ในระบบ ศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศ และช่วงเวลาในการถ่ายเทน้ำหมักด้วย โดยจะศึกษา

2.1 การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง เมื่อผลผลิตเอทานอลสูงถึงร้อยละ 8 (โดยปริมาตร) เริ่มทำการถ่ายเทน้ำหมักร้อยละ 25 ทุก 3 และ 4 ชั่วโมง

2.2 การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการทดลอง แล้วหยุดให้อากาศขณะทำการหมัก ต่อเมื่อเวลาผ่านไปก็จะเริ่มให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที จนได้ปริมาณเซลยีสต์ 300 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร แล้วหยุดให้อากาศปล่อยให้น้ำหมักอยู่ในสภาวะที่มีอากาศจำกัดต่อไป ขั้นตอนนี้จะศึกษาช่วงเวลาในการถ่ายเทน้ำหมักทุก 4 และ 5 ชั่วโมง

2.3 การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการทดลองแล้วลดปริมาณอากาศลงเป็น 0.04-0.06 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ตลอดการทดลอง ขั้นตอนนี้จะเริ่มถ่ายเทน้ำหมักร้อยละ 25 ทุก 4 ชั่วโมง

2.4 การใช้สภาวะทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3 แต่เมื่อระบบเข้าสู่สภาวะการผลิตที่สม่ำเสมอแล้ว จึงเปลี่ยนอัตราการให้อากาศเป็น 0.16-0.18 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที และทดลองหมักโดยไม่ให้อากาศเลย

3. ศึกษาเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่อง

อาศัยพื้นฐาน ความรู้ และขั้นตอนการผลิตเอทานอลจากระบบกึ่งต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องหมักจากรูปที่ 3-1 เมื่อเอทานอลเพิ่มปริมาณถึงระดับหนึ่ง จะตรวจหาปริมาณเอทานอล ความเข้มข้นของเซลยีสต์ และน้ำตาลอินเวิร์ท จากนั้น เริ่มถ่ายเทน้ำหมักและป้อนสารอาหารโดยอาศัยปั๊มควบคุมการไหลของสารอาหารเข้าสู่คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ ขณะเดียวกันเปิดวาล์วทางตอนล่างของคอลัมน์นี้ ปล่อยให้น้ำหมักไหลล้นไปยังคอลัมน์ถัดไป ทำการวิเคราะห์น้ำหมักทุกคอลัมน์ ในช่วงเวลา $t = t_r$ (Residence time) ของหนึ่งคอลัมน์ ทำการวิเคราะห์จนกว่าระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลย์ การผลิตเอทานอลด้วยระบบต่อเนื่องนี้ จะศึกษาเกี่ยวกับ

3.1 อิทธิพลของการให้อากาศรวมถึงระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดการหมักภายในคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ และศึกษาอัตราการเจือจางที่เหมาะสม โดยแบ่งออกเป็น

3.1.1 ให้อากาศอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการหมัก อัตราการเจือจางน้ำหมัก 0.11 ชั่วโมง$^{-1}$ เริ่มปล่อยสารอาหารเข้าคอลัมน์เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และ 16 ชั่วโมง

3.1.2 ให้อากาศอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นลดปริมาณอากาศลงเป็น 0.04-0.06 vvm ตลอดการทดลอง อัตราการเจือจาง 0.17 ชั่วโมง$^{-1}$ เริ่มปล่อยสารอาหารเมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และ 21 ชั่วโมง

การกำหนดวิธีวิเคราะห์

1. ปริมาณน้ำตาลในสารอาหาร ใช้เครื่องแฮนด์ รีแฟรคโตมิเตอร์
2. ปริมาณน้ำตาลอินเวิร์ท ใช้วิธีของ Lane-Eynon (Pearson, 1970)
3. ความเป็นกรด-ด่าง ใช้เครื่องวัด pH
4. ปริมาณเซลยีสต์ทั้งหมด อาศัยวิธีการนับจาก Haemocytometer
5. ปริมาณเอทานอล ใช้วิธีของ A.O.A.C., 1980.