บทที่ 3

อุปกรณ์และการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

3.1.1 เครื่องพาสเจอร์ไรซ์ รูปที่ 3.1ก

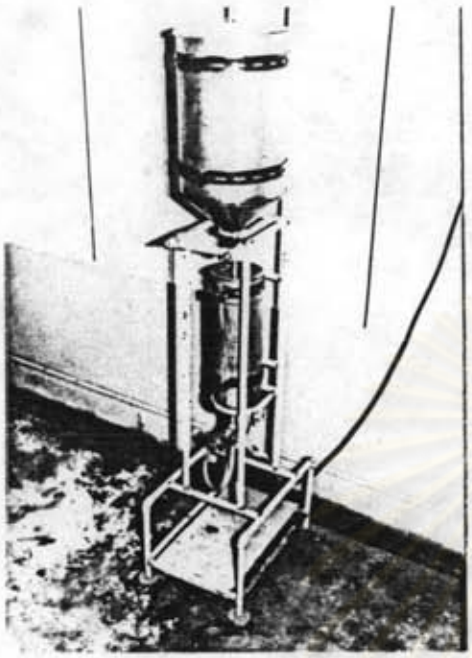
ประกอบด้วยถังเก็บน้ำสับปะรดก่อนที่จะผ่านการให้ความร้อน ทางด้านล่างของถังต่อเข้ากับท่อสเตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 เซนติเมตร ขดเป็นวงกลมหลาย ๆ ชั้น ให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุอยู่ในถังสเตนเลสทรงกระบอกบรรจุน้ำ และมีขดลวดให้ความร้อน (heating coil) อยู่ภายในถัง

หลักการพาสเจอร์ไรซ์ สำหรับเครื่องมือชุดนี้ อาศัยน้ำเป็นตัวนำความร้อนจากขดลวดให้ความร้อนไปยังน้ำสับปะรดที่ไหลผ่านท่อสเตนเลสซึ่งปลายท่อมีวาล์วปิด-เปิด ใช้ในการควบคุมการไหลออกของน้ำสับปะรด เพื่อให้น้ำสับปะรดได้รับความร้อนสูงถึงอุณหภูมิที่ต้องการ น้ำสับปะรดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วจะนำไปเก็บไว้ในถังเก็บ ทิ้งให้เย็น ก่อนจะปั๊มเข้าสู่คอลัมน์สำหรับหมัก

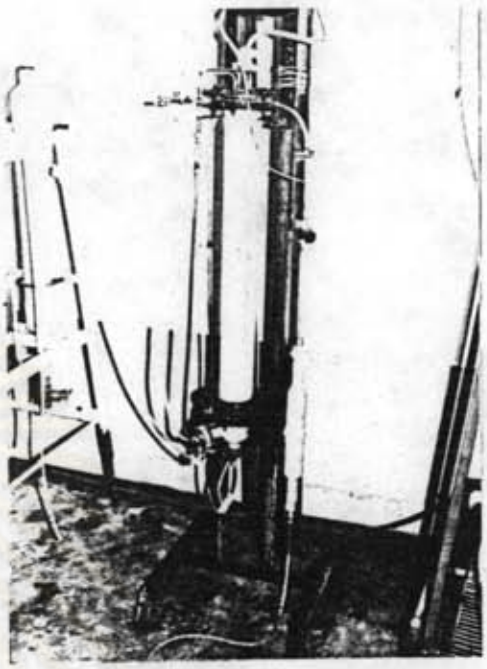
3.1.2 คอลัมน์สำหรับหมัก แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

3.1.2.1 คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ จำนวน 1 คอลัมน์ เป็นคอลัมน์แก้ว ที่เคยใช้ในงานวิจัยของวิชาพงษ์ (2525) ดังรูปที่ 3.1ข และรายละเอียดในรูปที่ 3.2

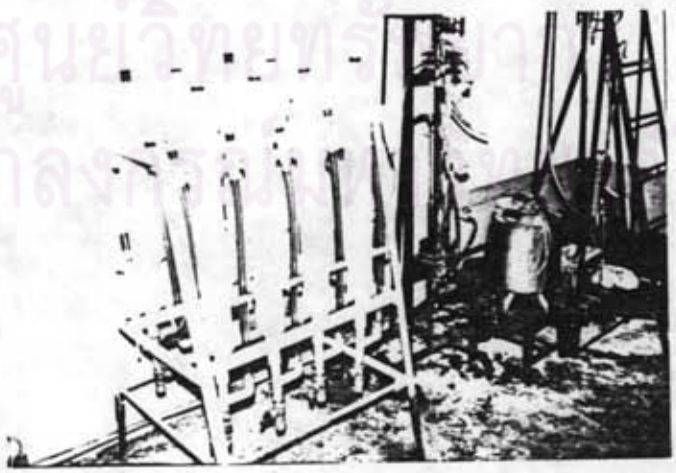
3.1.2.2 คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ จำนวน 8 คอลัมน์ (ศจี, 2528) แต่ละคอลัมน์ทำด้วยท่อพีวีซี ชนิดแข็ง เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร ที่ฝาปิดตอนบนเป็นรูปกรวย ซึ่งนำมาสวมเข้ากับท่อพีวีซี ขนาด 4 เซนติเมตร ปลายท่ออุดด้วยจุกยางซึ่งเจาะรูตรงกลาง สำหรับใส่ท่อพีวีซี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร (ความยาวของปลายท่อจะอยู่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของน้ำหมักในคอลัมน์) เพื่อไว้เป็นจุดที่ต่อเข้ากับระบบกำจัดฟองของคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ และใช้เป็นจุดที่จะตั้งตัว



รูปที่ 3.1ก เครื่องพาสเจอไรซ์



รูปที่ 3.1ข คอลัมน์เครื่องหมักที่มีการให้อากาศ



รูปที่ 3.1ค คอลัมน์เครื่องหมักที่ไม่มีการให้อากาศ

อย่างออกมาวิเคราะห์ โดยใช้สายดูดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับฝาปิดคอลัมน์ตอนล่าง จะเป็นรูปกรวยสวมกับท่อทรงกระบอกเช่นเดียวกับฝาปิดตอนบน รูทางออกมีท่อแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งต่อท่อซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตรตรงออกมา มีวาล์วปิดเปิดที่ปลายท่อสำหรับดึงเซลยีสต์ และน้ำหมักออกมา ส่วนอีกทางหนึ่งต่อท่อสั้น ๆ ขนาดเดียวกันในลักษณะตั้งฉากกับท่อแรก จากนั้นต่อตั้งฉากขนานขึ้นไปกับตัวคอลัมน์ด้วยท่อยาง จนถึงระดับความสูง 75 เซนติเมตร แล้วแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งเป็นท่อตรงสำหรับให้ฟองล้น และเป็นทางออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เซลยีสต์ผลิตขึ้น สำหรับอีกทางหนึ่งเป็นท่อต่อในลักษณะตั้งฉาก โดยปลายท่อนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตร ต่อเข้ากับคอลัมน์ถัดไป ดังรูปที่ 3.1ค

3.2 การเตรียมการหมัก

3.2.1 ยีสต์ ใช้ S. cerevisiae จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หรือ S. ellipsoideus จากโรงงานกรมสรรพสามิต จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเก็บรักษาเชื้อบนอาหารแข็ง P.D.A. (potato dextrose agar) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน ก่อนจะนำมาใช้จะถ่ายเชื้อใหม่แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 น้ำสับปะรด ใช้ผลสับปะรดสุกที่ผ่านการล้าง ปอกเปลือกสับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำเข้าเครื่องบีบเพื่อแยกน้ำสับปะรดออกจากส่วนกากสับปะรด แล้วกรองน้ำสับปะรดด้วยผ้าขาวบาง หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของน้ำสับปะรดให้มีสารละลายน้ำตาลเป็น 18 บริกซ์ ด้วยน้ำตาลทรายขาว ปรับ pH 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) (ระหว่างทำการทดลองในน้ำหมักไม่มีการปรับ pH) นำผ่านเข้าเครื่องพาสเจอร์ไรส์แล้วทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

3.2.3 เครื่องหมัก สำหรับเครื่องหมักทุกคอลัมน์เราจะทำให้ปราศจากเชื้อ โดยแช่ด้วยน้ำยาซึ่งใช้ล้างคราบไขมัน เช่น น้ำยาทีโพล เป็นต้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปา ตามด้วยเอทานอลผสมน้ำร้อยละ 80 โดยปริมาตร (Aibe, 1968) และที่กรองอากาศทำความสะอาดให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นบรรจุด้วยสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว (วิชาพงษ์, 2525)

3.2.4 เชื้อหมักเริ่มต้น เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในคอลัมน์แรกที่มีการให้อากาศ โดยใช้น้ำสับปะรดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 ร้อยละ 5 ของปริมาตรน้ำหมักที่จะทำการหมักใน

คอลัมน์แรก เติมสารอาหารตามสูตร ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.05 (w/v), แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.05 (w/v), และแมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.01 (w/v) ทำการฆ่าเชื้อในหม้อต้มอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อยีสต์ที่กำลังเจริญเติบโตลงไป (เชื้อยีสต์ จำนวน 10 หลอด) หลังจากนั้นถ่ายลงในคอลัมน์ด้วยเทคนิคที่ปราศจากเชื้อ และให้อากาศผ่านหัวกระจายในอัตรา 0.5 vvm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลยีสต์ในช่วงแรกให้มีความเข้มข้นประมาณ 400 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร (ศจี, 2528)

3.3 <u>วิธีการทดลอง</u>

การทดลองหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในเครื่องหมักชนิดหลายคอลัมน์ อาศัยข้อมูลจากกำรผลิตเอทานอลแบบกึ่งต่อเนื่อง และแบบต่อเนื่อง (ศจี, 2528) โดยเติมน้ำสับปะรดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 พร้อมทั้งสารอาหารเสริมที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนตามสูตร ลงในคอลัมน์ที่เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น จนได้ปริมาณ 8 ลิตร ให้อากาศผ่านหัวกระจายอากาศอัตรา 0.5 vvm ในระยะ 4 ชั่วโมงแรก ของการหมัก ดูดอากาศออกจากท่อบ้อนย้อนกลับเพื่อให้น้ำหมักไหลหมุนเวียน จากนั้นลดอัตราการให้อากาศเป็น 0.04-0.06 vvmตลอดการทดลอง อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส

3.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบผลของทิศทางการไหลของน้ำหมัก ในคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ

3.3.1.1 เริ่มปล่อยน้ำหมักจากตอนล่างของคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น คอลัมน์ที่ 1) หลังจากเวลาการหมักผ่านพ้นไปได้ 21 ชั่วโมง โดยให้ไหลล้นเข้าตอนบนของคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 2) แล้วไหลล้นจากตอนล่างของคอลัมน์นี้ไปเข้าตอนบนของคอลัมน์ถัดไป ตามลำดับจนครบ 8 คอลัมน์ พร้อมกับปล่อยน้ำสับปะรดข้อ 3.2.2 เข้าคอลัมน์ที่มีการให้อากาศตลอดเวลา ดังรูปที่ 3.3 ก ในอัตราการเจือจาง 0.17 ต่อชั่วโมง (ศจี, 2528) ทดลองแปรค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่สุดโดยยังคงรักษาสภาวะสมดุล (steady state) คือเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ และปริมาณเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับผลงานของ ศจี (2528)

3.3.1.2 เริ่มปล่อยน้ำหมักจากตอนล่างของคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 1) หลังจากเวลาการหมักผ่านพ้นไปได้ 21 ชั่วโมง โดยให้ไหลล้นเข้าตอนล่างของคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 2) แล้วไหลล้นออกตอนบนของคอลัมน์นี้ไปเข้าตอนล่างของคอลัมน์ถัดไปตามลำดับ จนครบ 8 คอลัมน์ พร้อมกับปล่อยน้ำล้นปะรด ข้อ 3.2.2 เข้าคอลัมน์ที่มีการให้อากาศตลอดเวลา ดังรูปที่ 3.3 ข ทดลองแปรค่าอัตราการเจือจาง เพื่อหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่สุด โดยยังคงให้รักษาสภาวะสมดุลอยู่ได้ แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับข้อ 3.3.1.1

3.3.2 ศึกษาผลของการนำเซลยีสต์กลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

3.3.2.1 ออกแบบวิธีการนำเซลยีสต์จากผลผลิตกลับมาใช้ใหม่โดยคำนึงถึง

- ความประหยัด และมีประสิทธิภาพสูง
- วิธีการใช้ ซ่อมแซม บำรุงรักษาได้ง่าย
- ความปลอดภัยจากการปนเปื้อนของเชื้ออื่น

ได้เลือกการนำน้ำหมักในส่วนล่างของคอลัมน์ที่มียีสต์ตกตะกอน โดยดึงน้ำหมักบางส่วน(by pass) ซึ่งจะมีทั้งเซลยีสต์ และน้ำหมักติดมาด้วย ทำให้ได้ทั้งเซลยีสต์ที่ตายแล้ว และอาหารที่ยังเหลืออยู่ในน้ำหมักซึ่งจะเป็นสารอาหารของเซลยีสต์ส่วนที่ยังมีชีวิตต่อไป

3.3.2.2 หาวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มกิจกรรมของเซลยีสต์ เมื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ในคอลัมน์ โดยนำถังน้ำหมักบางส่วน จากคอลัมน์สุดท้ายไปเข้าในคอลัมน์แรกที่มีการให้อากาศ 0.04-0.06 vvm ตลอดเวลา ซึ่งจะช่วยทำให้เพิ่มกิจกรรมของเซลยีสต์โดยไม่มีผลกระทบต่อเอทานอลในระบบ (Lyons, 1981) ดังรูปที่ 3.3 ค ซึ่งจะเป็นวิธีที่ประหยัดแทบจะไม่เพิ่มค่าใช้จ่ายใด ๆ เลย อีกทั้งง่ายต่อการทำการทดลองด้วย

3.3.2.3 หาสภาวะที่เหมาะสม หลังจากที่ระบบการหมักมีการนำเซลยีสต์กลับมาใช้ใหม่ (โดยทิศทางการไหลของน้ำหมักที่เหมาะสม ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.1) ทดลองแปรค่าปริมาณการนำน้ำหมักที่มีเซลยีสต์กลับมาใช้ใหม่ เป็น 3 ค่า คือ 7, 10, 13 มิลลิลิตรต่อนาที (หรือ 0.42,0.60, 0.78 ลิตรต่อชั่วโมง) ตามลำดับ และหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่สุด โดยยังคงรักษาสภาวะสมดุลในแต่ละค่าของปริมาณการดึงน้ำหมักกลับนั้น ๆ

3.3.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุการเกษตรอื่น ๆ มาใช้ในกระบวนการหมักโดยใช้เครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่อง นอกเหนือจากน้ำสับปะรด โดยใช้น้ำอ้อย และใช้สภาวะการทดลองจากข้อ3.3.2.3 โดยเลือกแปรค่าปริมาณการดึงน้ำหมักกลับ เพียงค่าเดียว คือ 7 มิลลิลิตรต่อนาที และหาค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมที่สุด สำหรับปริมาณการดึงน้ำหมักกลับนี้

3.4 วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์น้ำหมักโดยจะทำการดึงน้ำหมักด้วยสายดูดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดจากท่อพีวีซี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร (ความยาวของปลายท่อจะอยู่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของน้ำหมักในคอลัมน์) ที่เสียบกับรูที่เจาะไว้ตรงกลางจุกยางซึ่งอุดไว้กับฝาปิดคอนบน ดึงจากทุกคอลัมน์ ในช่วงเวลา t = tr (residence time) = v/q (v = working volume, q = volumetric flow rate) ของหนึ่งคอลัมน์ มาทำการวิเคราะห์ ดังนี้ :-

3.4.1 ความเข้มข้นของเซลยีสต์

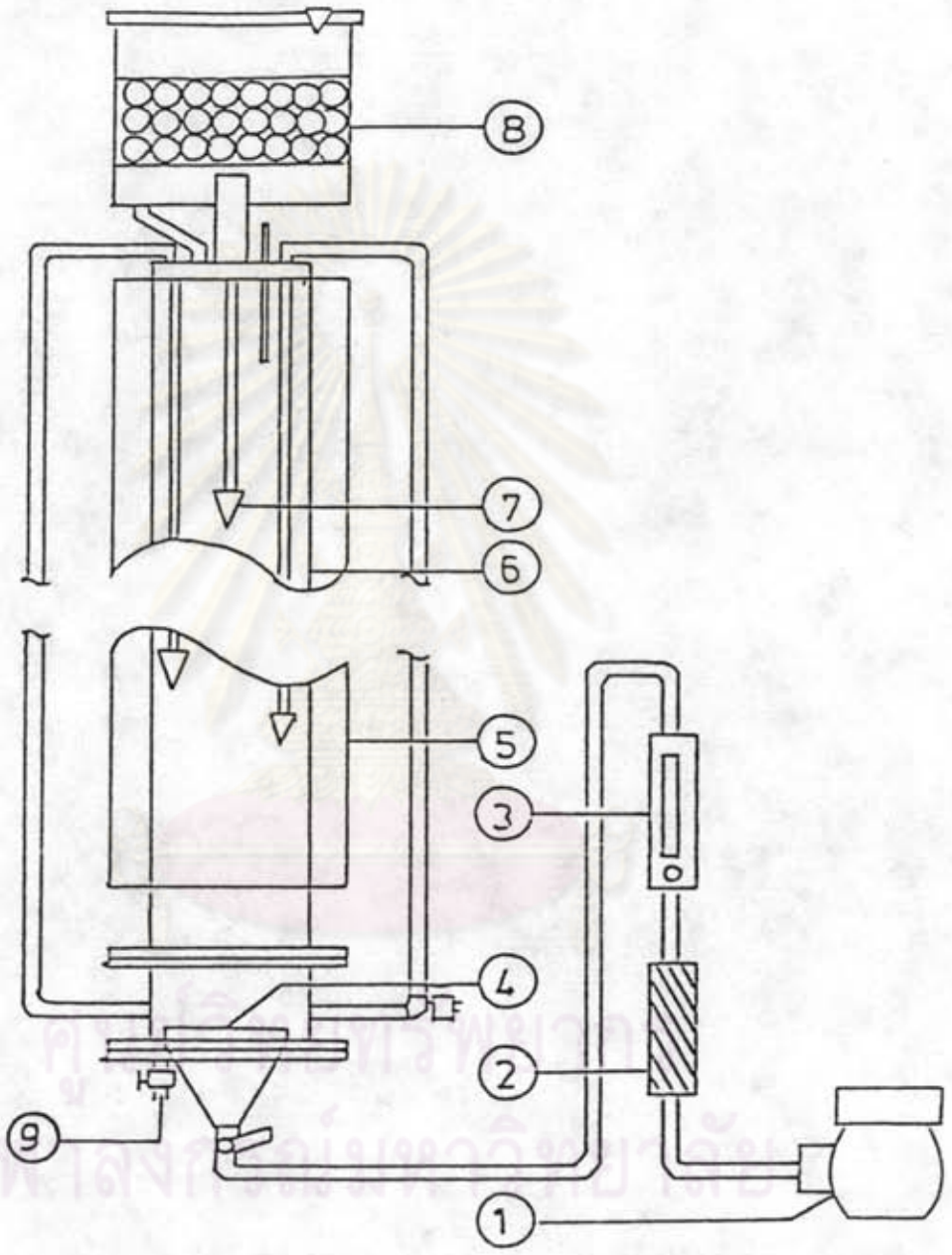
3.4.1.1 โดยวิธีนับจำนวนเซลยีสต์ทั้งหมดจากกล้องจุลทรรศน์ โดยตรง (direct microscopic counts, DMC) (ภาคผนวก ก)

3.4.2 วัดสภาพความเป็นกรด-ด่าง

3.4.3 หาปริมาณน้ำตาลในน้ำสับปะรดและน้ำหมัก

3.4.3.1 ปริมาณของแข็งรวมที่ละลายได้ (total soluble solid) ด้วยเครื่อง hand refractometer

3.4.4 ปริมาณเอทานอลในน้ำหมัก ใช้วิธีใน Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 1980 (ภาคผนวก ก)

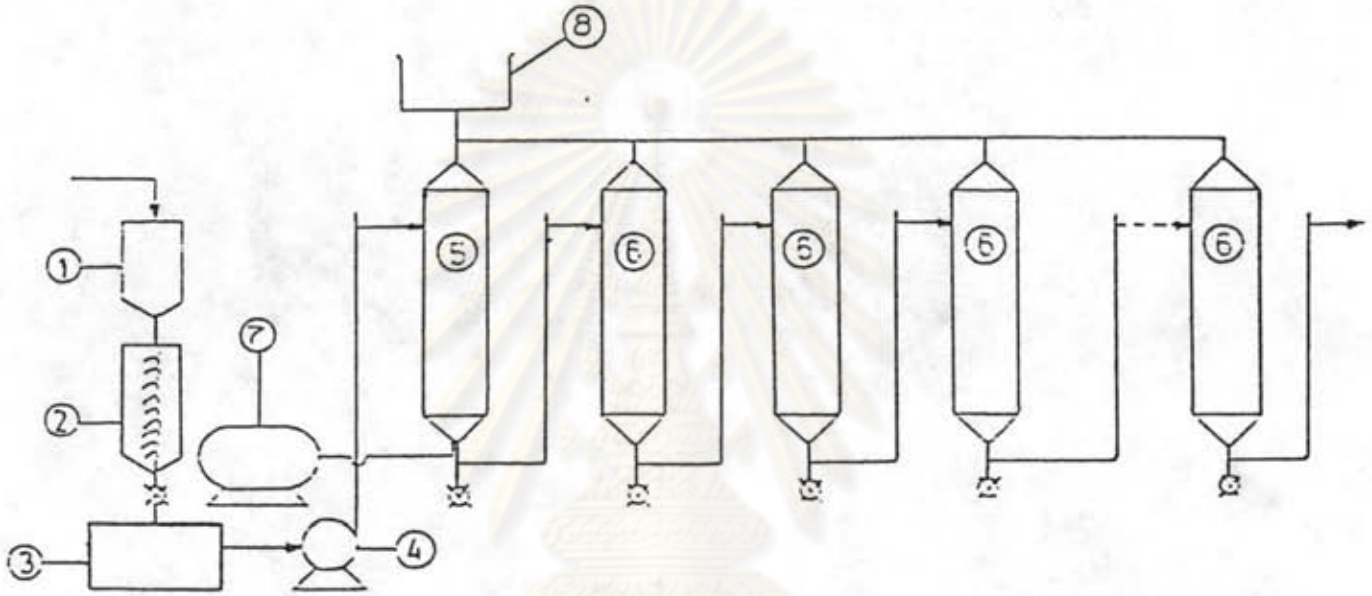


รูปที่ 3.2 ส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักแบบคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ

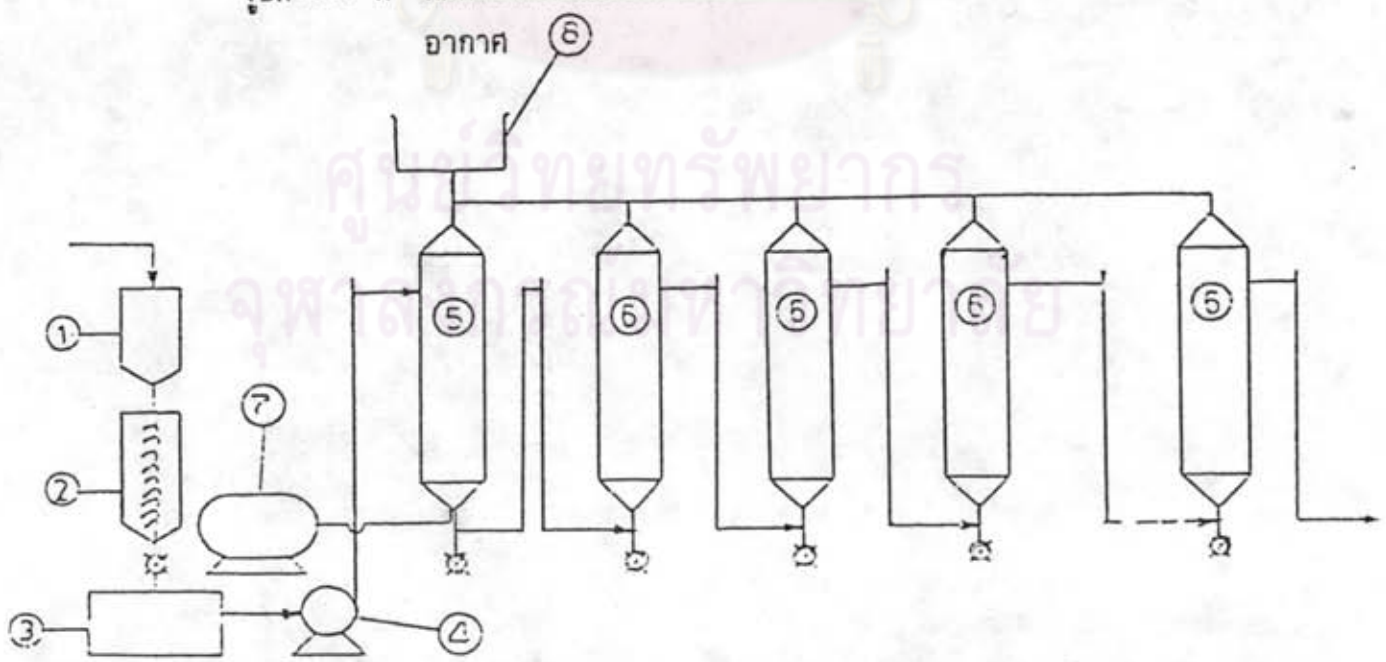
1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
4. ตัวกระจายอากาศ
5. ระบบหล่อเย็น
6. ตัวคอลัมน์
7. ระบบไหลป้อนย้อนกลับ
8. ระบบกันฟองล้น
9. วาล์วท่อที่จะต่อเข้ากับคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ

รูปที่ 3.3 ก, ข และ ค ส่วนต่างๆของเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดต่อเนื่อง

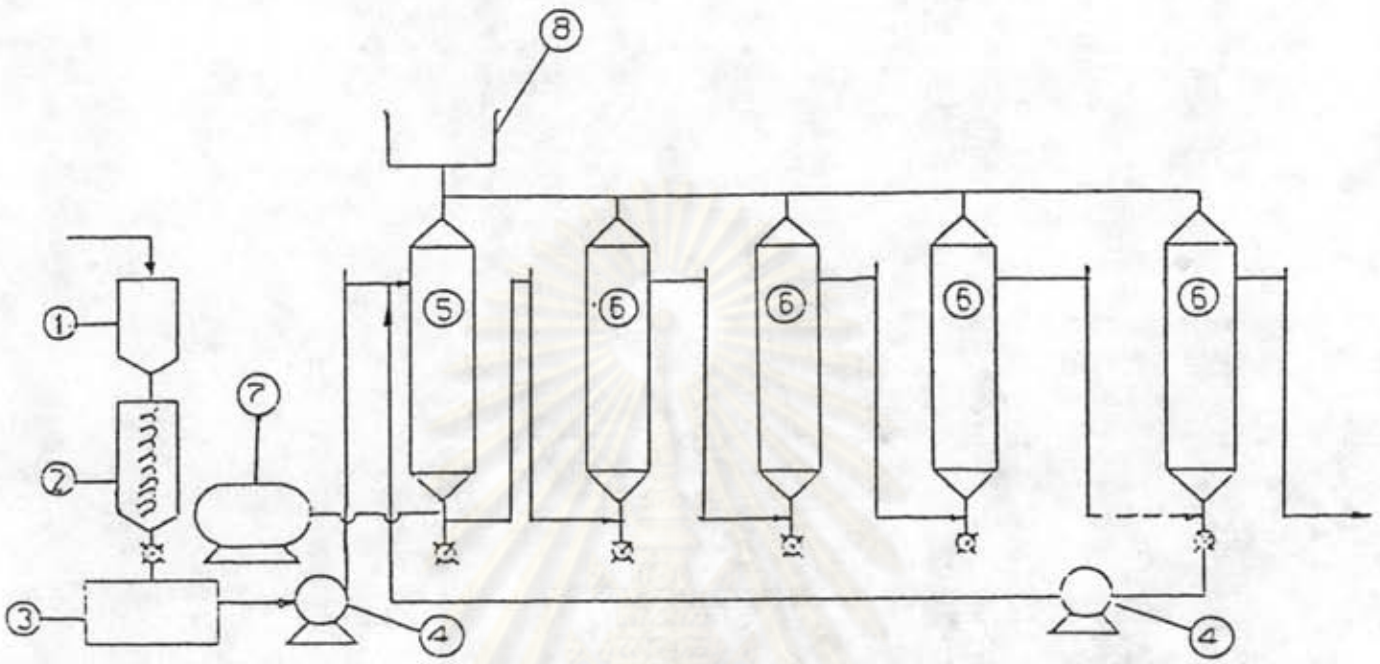
1. ถังเก็บสารอาหารก่อนผ่านการให้ความร้อน
2. ถังพาสเจอร์ไรซ์
3. ถังเก็บสารอาหารหลังผ่านการให้ความร้อน
4. ปั๊ม
5. คอลัมน์ที่มีการให้อากาศ
6. คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ
7. เครื่องอัดอากาศ
8. ระบบกำจัดฟอง



รูปที่ 3.3 ก ทิศทางการไหลเข้าทางตอนบนของน้ำหมักในคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ



รูปที่ 3.3 ข ทิศทางการไหลเข้าทางตอนล่างของน้ำหมัก ในคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ



รูปที่ 3.3ค ทิศทางการไหลเข้าทางตอนล่างของน้ำหมักในคอลัมนที่ไม่มีการให้อากาศ พร้อมทั้งมีการป้อนย้อนกลับของน้ำหมัก(cell recycle)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย