

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- น้ำมะพร้าวแก่ จากตลาดหัวอิฐ อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช
- น้ำกากส่าจากโรงงานสุรากลั่นชุมชน สก.ย. หมู่ 5 ตำบลพรหมโลก อำเภอพรหมคีรี

จังหวัดนครศรีธรรมราช

- น้ำตาลจากของ ตำบลขนานนาก อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

2. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- กรดอะซิติก (acetic acid, glacial) ยี่ห้อ J.T.Baker ANALYZED
- แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ยี่ห้อ Scharlau ChemieS.A.
- แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) ยี่ห้อ Riedel-de Haen
- ยีสต์สกัด (yeast extract powder) ยี่ห้อ HIMEDIA RM027

3. เชื้อจุลินทรีย์

- หัวเชื้อ *Acetobacter xylinum*

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1 อุปกรณ์ในการเตรียมน้ำตาลจาก

บีกเกอร์ (beaker) หม้อสแตนเลส (stainless pot) ผ้าขาวบาง (cloth) และกรวย กรอง (funnel)

4.2 อุปกรณ์ในการเตรียมหัวเชื้อ

ปิเปต (pipette) หลอดทดลอง (test tube) ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) และลูกยางไปเปต (pipet bulb)

4.3 อุปกรณ์ในการผลิตวุ้นมะพร้าวในห้องปฏิบัติการ

กล่องพลาสติกขนาดกว้างxยาวxสูง (14x17x7 เซนติเมตร) กระบอกตวง (graduated cylinder) กระดาษ (paper) ยางรัด (rubber) ช้อนตักสาร (spatula) และขวดฝาเกลียว (laboratory bottle)

4.4 อุปกรณ์ในการเตรียมหัวเชื้อและผลิตวุ้นมะพร้าวในโรงงาน

4.4.1 อุปกรณ์ในการเตรียมหัวเชื้อ

ขวดแก้วขนาด 625 มิลลิลิตร สายยางซิลิโคน หลอดแก้ว ทัพพีสำหรับคน กระดาษหนังสือพิมพ์ และสายยางสำหรับรด

4.4.1 อุปกรณ์ในการผลิตวุ้นมะพร้าว

พิมพ์พลาสติกขนาดกว้างxยาวxสูง (24x40x10 เซนติเมตร) กระจบอกลง กระดาษหนังสือพิมพ์ สายยางสำหรับรดพิมพ์ เขี่ยกสเดนเลสสำหรับตักน้ำมะพร้าว ผ้าขาวบาง ตะกร้าพลาสติก และหม้อสำหรับต้มขนาด 60 ลิตร

5. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการทดลอง

- 5.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 4330
- 5.2 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (electric balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น PB- 210s
- 5.3 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น ss-245
- 5.4 หม้อนึ่งความดันแบบใช้เตาแก๊ส
- 5.4 ตู้อบไฟฟ้า (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น D 06062
- 5.5 เครื่องวัดสี (colorimeter) ยี่ห้อ Hunter Color System รุ่น Color Flex 45/0
- 5.6 เครื่องมือวัดอย่างละเอียด (verniercaliper) ยี่ห้อ HOREX รุ่น 90705
- 5.7 โถดูดความชื้น (Descicater)
- 5.8 เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (hot plate) ยี่ห้อ Jenway รุ่น 1203
- 5.9 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (electric balance) ยี่ห้อ Swiss Quality รุ่น Precisa 6200D

วิธีการทดลอง

1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มปริบูรณ์ (Complete Randomized Design: CRD) โดยกำหนดจำนวนซ้ำ (Replication) เท่ากับ 3 ซ้ำ

2. การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำมะพร้าวมา 1 ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม (0.5 เปอร์เซ็นต์) กรดอะซิติก 10 มิลลิลิตร (1 เปอร์เซ็นต์) และยีสต์สกัด 0.5 กรัม (0.05 เปอร์เซ็นต์) บรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตรขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหหัวเชื้อ *Acetobacter xylinum* 10 มิลลิลิตร ป่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน

3. การเตรียมน้ำกากส่า

นำน้ำกากส่าที่เหลือจากการกลั่นสุราของโรงงานสุรากลั่นชุมชน สก.ย. หมู่ 5 ตำบลพรหมโลก อำเภอพรหมคีรี จังหวัดนครศรีธรรมราช มาทำให้มีความเข้มข้นโดยการใช้เครื่องกลั่นแบบลดความดัน (rotary evaporation) ทำการกลั่นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ระดับความดัน 800 psi เพื่อไล่น้ำออกไปส่วนหนึ่ง นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

3. ขั้นตอนการผลิตวุ้นมะพร้าว

ปรับสูตรน้ำหมักตามแผนการทดลอง บรรจุใส่ขวดฝาขนาด 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทใส่ภาชนะพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมหหัวเชื้อ *Acetobacter xylinum* 10 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากภาชนะด้วยกระดาษแล้วรัดด้วยสายยาง ป่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างวัดความหนาในวันที่ 0 2 4 6 8 และ 10 จากนั้นเก็บตัวอย่างวันสุดท้ายหาปริมาณผลผลิต (% yield) และวัดค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE) ด้วยเครื่องวัดสี (colourimeter) ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Color Flex 45/0

$$\text{ปริมาณผลผลิต (\% yield)} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย} \times 100}{\text{น้ำหนักริมต้น}}$$

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวุ้นมะพร้าว

ตอนที่ 1 ศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลทรายกับน้ำตาลจากต่อผลผลิตวุ้นมะพร้าว (ตามวิธีของวิลาวด์ คักดามี และมยุรี ไชยวิจารณ์, 2547)

นำน้ำมะพร้าวมาเติมน้ำตาลจากที่แปรระดับความเข้มข้นเป็น 5 6 7 8 9 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นเป็น 5.0 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น แล้วนำมาเปรียบเทียบกับวุ้นที่ผลิตด้วยน้ำมะพร้าวแบบดั้งเดิม

ตอนที่ 2 ศึกษาค่าของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมของน้ำหมักเริ่มต้น

คัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจากการทดลองตอนที่ 1 ที่แผ่นวุ้น

หนาที่สุด และผลผลิตสูงสุด แปรระดับความเป็นกรด-ด่างเป็น 3.5 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกรดอะซิติก และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

ตอนที่ 3 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำกากส่า

คัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจากการทดลองตอนที่ 1 และปรับความเป็นกรด-ด่างตามตอนที่ 2 ที่แผ่นวุ้นหนาที่สุดและผลผลิตสูงสุดมาใช้ โดยแปรระดับความเข้มข้นของน้ำกากส่าเป็น 0 1 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ และนำแผ่นวุ้นมะพร้าวที่ได้ผลิตด้วยน้ำตาลจากมาฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 0 24 และ 36 ชั่วโมง นำมาวัดค่าสี (L^* , a^* , b^*) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสีก่อนฟอก และหลังการฟอก

ตอนที่ 4 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

คัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลจากการทดลองตอนที่ 1 และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตามการทดลองตอนที่ 2 ที่แผ่นวุ้นหนาที่สุดและผลผลิตสูงสุดมาใช้ โดยแปรระดับความเข้มข้นของ $MgSO_4$ เป็น 0 0.2 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 เปอร์เซ็นต์

ตอนที่ 5 ศึกษาเปรียบเทียบผลของการใช้น้ำกากส่าร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟตต่อประสิทธิภาพการสร้างแผ่นวุ้นมะพร้าว

คัดเลือกระดับของน้ำกากส่าจากการทดลองที่ 3 และ $MgSO_4$ จากตอนที่ 4 ที่แผ่นวุ้นมีความหนาและร้อยละของผลผลิตสูงสุดมาใช้ เก็บตัวอย่างวัดความหนาของแผ่นวุ้นในวันที่ 0 2 4 6 8 และ 10 เก็บตัวอย่างในวันสุดท้ายของการหมักมาหาร้อยละของผลผลิตเปรียบเทียบกับการใช้น้ำกากส่า แมกนีเซียมซัลเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียว

ตอนที่ 6 ขยายกำลังการผลิตสู่ระดับ pilot plant เพื่อเป็นโรงงานนำร่อง

ใช้แหล่งชุมชนเป็นโรงงานนำร่องในการร่วมศึกษาแบบมีส่วนร่วม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการขยายกำลังการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมวิสาหกิจชุมชน โดยทำการผลิตวุ้นมะพร้าวจากน้ำมะพร้าวที่เหลือทิ้ง ใช้น้ำตาลจากเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้น้ำกากส่าและแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการผลิตจริงในโรงงานนำร่องโดยใช้โรงงานผลิตวุ้นมะพร้าวเมืองคอนของนายนิคม หนูวรรณ อยู่บ้านเลขที่ 22/154 หมู่ 1 ตำบลโพธิ์เสด็จ อำเภอเมือง จังหวัด

นครศรีธรรมราช ทำการผลิตวุ้นมะพร้าวจำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 12 พิมพ์ โดยนำน้ำมะพร้าวจากตลาด หัวธูมาจำนวน 40 ลิตร กรองผ่านผ้าขาวบาง ผ่านใส่ในหม้อขนาด 60 ลิตร เติมน้ำตาลจาก 2.5 กิโลกรัม (ความหวานของน้ำตาลจาก 80 บริกซ์) เติมน้ำกาสุ 1,200 มิลลิลิตร และเติม แมกนีเซียมซัลเฟต 80 กรัม นำไปต้มให้เดือดหลังจากเดือดให้จับเวลา 45 นาที ยกหม้อลงจากเตา เติมกรดอะซิติกเข้มข้นจำนวน 160 มิลลิลิตร รอจนน้ำมะพร้าวเย็น ตักน้ำมะพร้าวใส่ในพิมพ์ พลาสติกขนาด 24x40x10 เซนติเมตร พิมพ์ละ 1.4 ลิตร ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ผ่านการฆ่า เชื้อแล้ว และรัดด้วยสายยางให้แน่น เติมหิวเชื้อ *Acetobacter xylinum* พิมพ์ละประมาณ 125 มิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วัน (ขั้นตอนการผลิตดังแสดงในภาพ ภาคผนวก ข.7) เก็บตัวอย่างวุ้นมะพร้าวมาหาปริมาณผลผลิต (%Yield)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 'new Multiple Rang Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 for Window