บทที่ 3

อุปกรณ์และการทดลอง

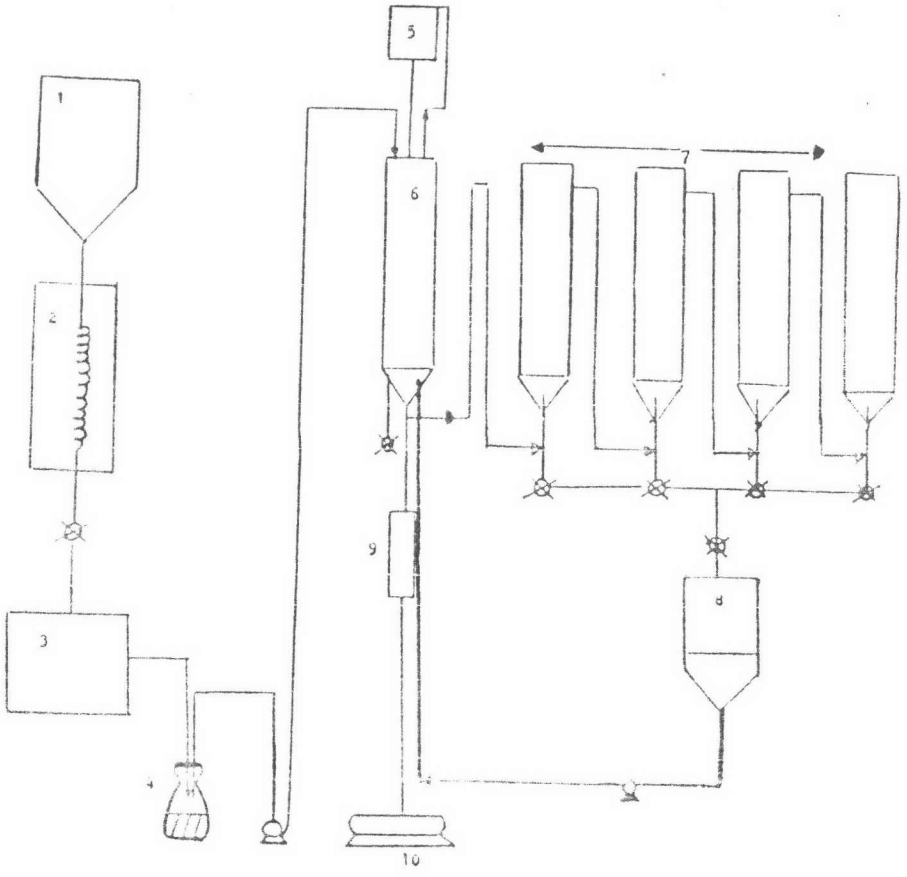
3.1 อุปกรณ์

รูปที่ 3.1 แสดงแผนผังระบบหมักเอธานอลในการทดลองนี้ ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ เครื่องพาสเจอไรซ์ คอลัมน์สำหรับหมัก และระบบการนำเซลยีสต์กลับมาใช้ มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 เครื่องพาสเจอไรซ์

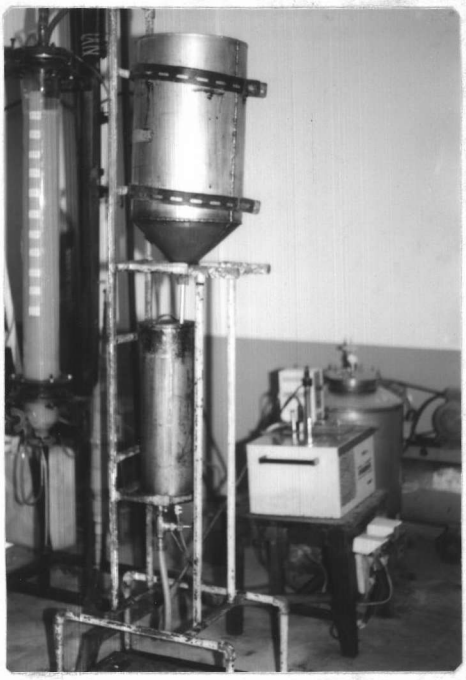
การทำพาสเจอไรซ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำสับปะรด เพื่อไม่ให้ก่อปัญหาในขั้นตอนการหมัก เครื่องพาสเจอไรซ์ประกอบด้วย ถังเก็บน้ำสับปะรดและถังให้ความร้อน โดยถังให้ความร้อน เป็นถังสแตนเลสทรงกระบอกมีฝาปิด ความจุประมาณ 30 ลิตร ทางด้านล่างของถังต่อเข้ากับท่อสแตนเลส ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 เซนติเมตร ขดเป็นวงกลมหลาย ๆ ชั้น ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร โดยบรรจุอยู่ภายในถังสแตนเลสทรงกระบอกที่บรรจุน้ำมันอยู่ภายในและมีขดลวดให้ความร้อน (heating coil) อยู่ภายในถัง ดังแสดงในรูปที่ 3.2

หลักการพาสเจอไรซ์ของเครื่องมือชุดนี้ อาศัยน้ำมันเป็นตัวนำความร้อนจากขดลวดให้ความร้อนผ่านไปยังน้ำสับปะรดที่ไหลผ่านท่อสแตนเลสที่ขดเป็นวงกลม ซึ่งปลายท่อนี้มีวาล์วปิด-เปิด ใช้ในการควบคุมอัตราการไหลออกของน้ำสับปะรด เพื่อให้น้ำสับปะรดได้รับความร้อนจนมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 80-90 องศาเซลเซียส น้ำสับปะรดที่ผ่านการให้ความร้อนจะไหลไปตามท่อสแตนเลสไปยังอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ซึ่งมีเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิของน้ำสับปะรด ช่วงแรก ๆ ที่น้ำสับปะรดยังมีอุณหภูมิต่ำกว่าที่กำหนด น้ำสับปะรดจะถูกป้อนกลับคืนสู่ถังเก็บ เพื่อให้ความร้อนต่อจนกระทั่งน้ำสับปะรดมีอุณหภูมิตามต้องการ เวลาในการพาสเจอไรซ์ประมาณ 20-30 นาที จนเมื่อได้น้ำสับปะรดที่มีอุณหภูมิตามต้องการแล้วจึงปล่อยให้ไหลเข้าถังพักน้ำสับปะรด ถังพักนี้เป็นถังสแตนเลสรูปทรงกระบอก มีฝาปิดสนิทไม่ให้อากาศเข้าออก ด้านบนฝามีช่องสำหรับระบายอากาศติดเครื่องกรองอากาศ (air filter) ถังเก็บนี้มีความจุถังประมาณ 60 ลิตร ใช้เก็บน้ำสับปะรดที่ผ่านการพาสเจอไรซ์แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจะปั๊มเข้าสู่คอลัมน์หมัก



1. ถังพักน้ำเสียประจำ
2. เครื่องแลกเปลี่ยนไอน้ำ
3. ถังเก็บน้ำเสียประจำ
4. ขวดดักตะกอน
5. เครื่องกำจัดฝอย
6. คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
   จำนวน 1 คอลัมน์
7. คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์
   จำนวน 8 คอลัมน์
8. ขวดดักตะกอน
9. ตัวรองอากาศ
10. เครื่องดูดอากาศ
11. ปั๊มเพอริสแตริก

รูปที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง
น้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดน้ำเสียประจำ



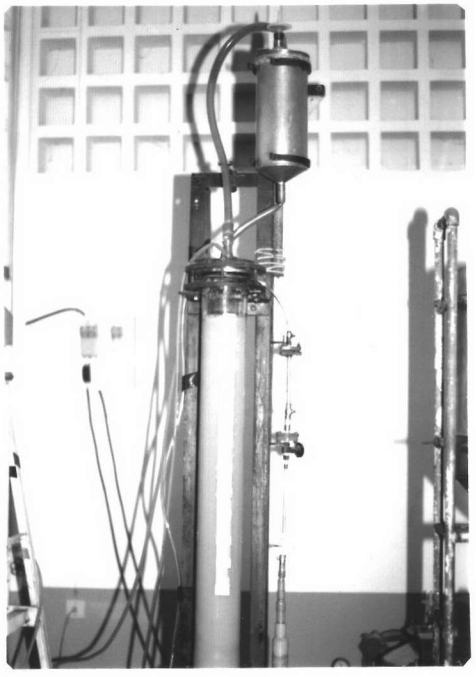
รูปที่ 3.2 เครื่องพาสเจอไรซ์

3.1.2 คอลัมน์หมัก แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

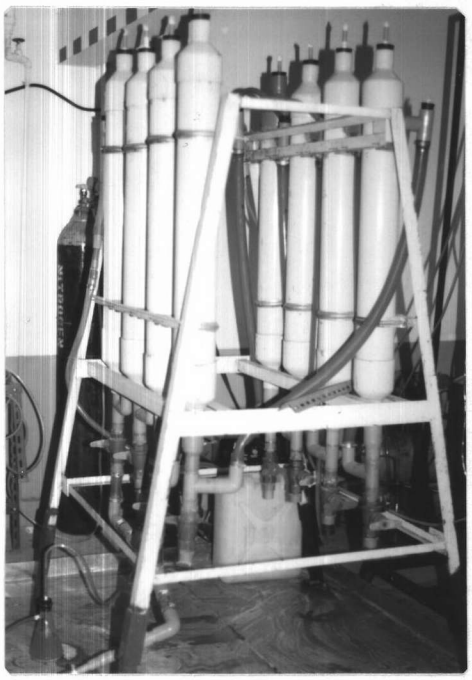
3.1.2.1 คอลัมน์ให้อากาศ จำนวน 1 คอลัมน์ ตัวคอลัมน์ทำด้วยแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 15 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร (วิชาพงษ์, 2525) ด้านบนมีช่องเติมสารอาหาร ช่องเติมเซลล์สต์ที่ดึงกลับมาใช้และมีช่องระบายอากาศซึ่งต่ออยู่กับเครื่องกำจัดฟอง ส่วนด้านล่างมีหัวกระจายอากาศและท่อปิด-เปิดและท่อไหลออกของน้ำหมักไปยังคอลัมน์ไม่ให้อากาศ คอลัมน์นี้ทำหน้าที่เติมจำนวนเซลล์สต์เพื่อใช้ในการหมักในขั้นตอนต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3.3

3.1.2.2 คอลัมน์ไม่ให้อากาศ จำนวน 8 คอลัมน์ นำมาต่ออนุกรมกันและเป็นแบบไหลย้อนขึ้น (upflow) (ศจี, 2528) ตัวคอลัมน์เป็นท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 เซนติเมตร และสูง 100 เซนติเมตร ที่ฝาปิดตอนบนเป็นรูปกรวยนำมาสวมเข้ากับท่อพีวีซีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ด้านบนของกรวยอุดด้วยจุกยางที่เจาะรูตรงกลางสำหรับใส่ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร โดยความยาวของปลายท่ออยู่ที่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของ

น้ำหมักในคอลัมน์ เพื่อใช้เป็นจุดดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์และเป็นทางออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระบบผลิตขึ้น ท่อสีวีซีถูกอุดด้วยสำลีที่ผ่านเยื่อแล้วไว้ตลอดการหมักเพื่อป้องกันการปนเปื้อน สำหรับฝาปิดคอลัมน์ตอนล่างเป็นรูปกรวยสวมกับตัวท่อสีวีซีที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตร มีวาล์วปิด-เปิดที่ปลายท่อสำหรับดึงเซลยีสต์และน้ำหมัก ส่วนทางออกอีกทางหนึ่งต่อท่อสั้น ๆ ขนาดเดียวกับในลักษณะที่ตั้งฉากกับท่อแรก จากนั้นต่อท่อยางตั้งฉากขนานขึ้นไปกับตัวคอลัมน์ จนถึงระดับความสูง 75 เซนติเมตร แล้วแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งเป็นท่อตรงปิดด้วยจุกยางซึ่งเจาะรูตรงกลาง มีหลอดแก้วอุดด้วยสำลีเสียบไว้เป็นทางออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนอีกทางหนึ่งเป็นท่อตั้งฉากกับท่อแรก ปลายท่อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ต่อเข้ากับคอลัมน์ถัดไป ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.3 คอลัมน์ให้อากาศ



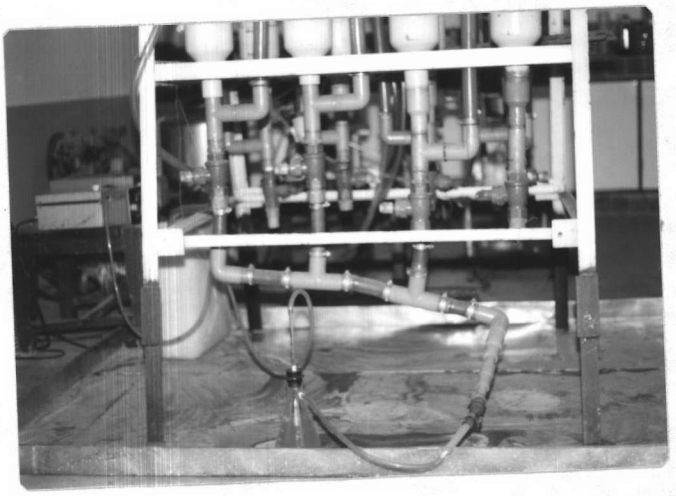
รูปที่ 3.4 คอลัมน์ไม่ให้อากาศ

3.1.3 ระบบนำเซลยีสต์กลับมาใช้

ตัวระบบประกอบด้วยท่อพีวีซีต่ออยู่กับท่อยางใส รัดด้วยเข็มขัดรัดท่อ แล้วนำมาต่อเข้ากับปลายทางออกของคอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศตัวที่ 6, 7, 8 ตามลำดับ มีความยาว 15, 12, 10 เซนติเมตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเชื่อมต่อท่อระหว่างคอลัมน์ตัวที่ 6, 7, 8 เข้าด้วยกัน มีความยาว 76 เซนติเมตร ส่วนปลายงอเป็นรูปตัวแอลยาว 30 เซนติเมตร นำมาต่อเข้ากับหลอดแก้วยาว 15 เซนติเมตรแล้วต่อกับสายยาง จากนั้นต่อเข้ากับขวด Suction flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้านบนปิดด้วยจุกยางที่เจาะรูตรงกลางสำหรับใส่หลอดแก้ว ซึ่งด้านบนสวมเข้ากับสายยางที่ต่อเข้า peristallic pump ดังแสดงในรูปที่ 3.5

3.2 การเตรียมการหมัก

3.2.1 ยีสต์ ใช้สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเก็บรักษาเชื้อบนอาหารแข็งP.D.A.(potato dextrose agar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน ก่อนจะนำมาใช้ จะถ่ายเชื้อใหม่แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.5 ระบบการนำเซลยีสต์กลับมาใช้

3.2.2 น้ำสับปะรด ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำสับปะรดเข้มข้นมาละลายกับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน น้ำสับปะรด 300 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่น 10 ลิตร จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของน้ำสับปะรดให้มีสารละลายน้ำตาลเป็น 18 บริกซ์ ด้วยน้ำตาลทรายขาว (1.5 กิโลกรัม) แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) แล้วนำน้ำสับปะรดที่ได้ไปกรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อกรองเอากากหรือตะกอนสับปะรดออกไป นำมาฆ่าเชื้อเครื่องพาสเจอไรซ์ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าระบบหมักอัลกอฮอล์ (คนอง, 2532)

3.2.3 การฆ่าเชื้อเครื่องหมัก เครื่องหมักทุกคอลัมน์ทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ด้วยน้ำยาไลซอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปา ตามด้วยเอธานอลผสมน้ำ ร้อยละ 80 โดยปริมาตร ส่วนที่กรองอากาศ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้วิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.4 เชื้อหมักเริ่มต้น ทำการเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในคอลัมน์ให้อากาศโดยใช้น้ำสับปะรดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 ร้อยละ 5 ของปริมาตรน้ำหมักที่จะทำการหมัก (8 ลิตร) แล้วเติมสารอาหารเสริมตามสูตรคือ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.05 (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.05 (w/v) และแมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 0.01 (w/v) ทำการฆ่าเชื้อในหม้อต้มอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง (ศจี,2528) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อยีสต์ที่กำลังเจริญเติบโตลงไป (จำนวนเริ่มต้นประมาณ 1,000 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร) ด้วยเทคนิคที่ปราศจากเชื้อ ลงใน flask ขนาด 1 ลิตร นำไปใส่เครื่องเขย่า ซึ่งควบคุมความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลยีสต์ในช่วงแรกให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น (ประมาณ 10,000 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร) เพื่อนำไปใช้ในระบบหมักต่อไป

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเริ่มต้นเดินระบบหมักอัลกอฮอล์ (Start - up) ทำการเตรียมการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นที่มีอายุ 24 ชั่วโมง พร้อมกับทำการพาสเจอไรซ์น้ำสับปะรด (ตามข้อ 3.2.2) ปริมาตร 7.5 ลิตร รวมกับใส่อาหารเสริมตามสูตร ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นที่ได้ลงในคอลัมน์ให้อากาศไปผสมกับน้ำสับปะรด ให้อากาศผ่านหัวกระจายอากาศด้วยอัตรา 0.5 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นลดอัตราการให้อากาศเป็น 0.04-0.06 vvm ตลอดการทดลอง (ศจี, 2528) หลังจากการหมักผ่านพ้นไป 21 ชั่วโมง ทำการปล่อยน้ำสับปะรดรวมกับอาหารเสริมตามสูตรที่ผ่านการพาสเจอไรซ์แล้วลงในคอลัมน์ให้อากาศ โดยการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารพร้อมกับปล่อยน้ำหมักจากตอนล่างของคอลัมน์ให้อากาศ โดยให้ไหลลันเข้าตอนล่างของคอลัมน์ไม่ให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 1) แล้วไหลล้นออกตอนบนของคอลัมน์ไปเข้าตอนล่างของคอลัมน์ถัดไปตามลำดับจนครบ 8 คอลัมน์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดลองแปรค่าตัวแปรต่างๆตามต้องการ จากงานวิจัยงานก่อน พบว่าที่สภาวะสมดุลจะให้อัตราการเจือจางเหมาะสม 0.0230 ชั่วโมง$^{-1}$ (คนอง, 2532) (เดิมค่าอัตราการเจือจางเป็น 0.1800 ชั่วโมง$^{-1}$ เมื่อคิด working volume 8 litre ส่วนค่า

อัตราการเจือจางใหม่ 0.0230 ชั่วโมง$^{-1}$ เมื่อคิด working volume 64 litre)

3.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับระบบหมักแบบต่อเนื่อง ในการศึกษาการทดลองนี้ เริ่มกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องด้วยสภาวะต่าง ๆ ที่ได้จากงานวิจัย (ศจี, 2528:คนอง, 2532) ยกเว้นจำนวนเซลยีสต์ที่เริ่มต้นต่างกัน ในงานวิจัยนี้ จำนวนเซลยีสต์ที่ใช้เริ่มต้น ประมาณ 1,200 ล้านเซลต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดลองแปรค่าอัตราการเจือจางต่าง ๆ คือ จนได้ค่าอัตราการเจือจางสูงสุดที่ระบบยังคงรักษาสมดุลไว้ได้

3.3.3 ศึกษาความสามารถของยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำสับปะรดเป็นเอธานอลในแต่ละคอลัมน์ มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เก็บตัวอย่างน้ำหมักทั้ง 9 คอลัมน์ คอลัมน์ละ 150 มิลลิลิตร

2. นำน้ำหมักที่ได้แต่ละคอลัมน์มาทำการนับจำนวนเซลทั้งหมด วัดความเข้มข้นสารละลายน้ำตาล และวัดเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์

3. ทำการเจือจาง (dilution) เซลแต่ละคอลัมน์ให้มีจำนวนใกล้เคียงกัน เพื่อทำการทดลองความสามารถเซลยีสต์แต่ละคอลัมน์ในการเปลี่ยนน้ำสับปะรดให้เป็นเอธานอล ในขั้นตอนต่อไป

4. ใช้บีเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายเซลที่เจือจางแล้ว ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ซึ่งมีน้ำสับปะรดตามข้อ 3.2.2 ใส่อาหารเสริมตามสูตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

5. นำไปใส่เครื่องเขย่าไซโคลเทอม ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

6. เมื่อครบกำหนดการหมัก 1 , 2 และ 3 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลยีสต์ทั้งหมด ความเข้มข้นสารละลายน้ำตาลและเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์ บันทึกผลและได้ทำการทดลองนี้ทำซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย

7. วิเคราะห์ผลดูว่าเซลยีสต์ในคอลัมน์ใดมีความสามารถในการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยมากเมื่อเทียบคอลัมน์อื่น ๆ เพื่อใช้ในการเลือกคอลัมน์ที่จะทำการดึงเซลกลับมาใช้ใหม่

3.3.4 ศึกษาการนำเซลยีสต์ย้อนกลับในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากงานวิจัยเดิม (คนอง,2532) สำหรับการนำเซลยีสต์จากคอลัมน์ไม่ให้อากาศคอลัมน์ที่ 8

กลับมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้เลือกวิธีดึงน้ำหมักบางส่วนจากตอนล่างของคอลัมน์ที่ 8 กลับไปเข้าในคอลัมน์ให้อากาศ ซึ่งมีอัตราการให้อากาศ 0.04 - 0.06 vvm ตลอดการทดลอง เมื่อระบบอยู่ในสภาวะสมดุล พบว่า อัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ 0.3250 อัตราเจือจางเหมาะสม 0.0380 ชั่วโมง$^{-1}$ ได้ให้อัตราการผลิตเอธานอลสูงสุด ที่ความเข้มข้นร้อยละ 11 โดยปริมาตร ดังนั้นจึงนำผลการทดลองนี้มาใช้พิจารณาวางแผนการทดลองนี้ โดยเลือกคอลัมน์ไม่ให้อากาศ คอลัมน์ที่ 5,6,7 (จากผลการทดลองที่ได้ข้อ 4.2 เนื่องจากเซลยีสต์ที่ไหลล้นจากตอนบนคอลัมน์ที่ 5 มาเข้าตอนล่างคอลัมน์ที่ 6 เป็นเซลที่มีอายุค่อนข้างมากและเริ่มจะอ่อนแอ แต่มีประสิทธิภาพการผลิตสูงกว่าเซลในคอลัมน์ที่ 6,7,8 ซึ่งเป็นเซลที่มีอายุมากและอ่อนแอเป็นส่วนใหญ่ มาทำการทดลองเปรียบเทียบผลการนำเซลกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง) จากนั้นทำการแปรค่าอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ 2 ค่า คือ 0.3 กับ 0.5 แล้วหาสภาวะที่เหมาะสม หลังจากที่ระบบการหมักมีการนำเซลยีสต์กลับมาใช้ใหม่และหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมสูงสุด โดยยังคงรักษาสภาวะสมดุลไว้ได้ ต่อมา ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบหมักระหว่างค่าอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ 0.3 และมีการดึงเซลยีสต์จากคอลัมน์คอลัมน์ที่ 5 , 6 และ 7 ตามลำดับ เทียบกับค่าอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ 0.5 เมื่อดึงเซลยีสต์จากคอลัมน์ที่ 5 , 6 และ 7 ตามลำดับ เพื่อที่จะทำการเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำเซลยีสต์กลับมาใช้ดูจากคอลัมน์ที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตสูงสุด คือ ผลิตเอธานอลที่มีเปอร์เซนต์อัลกอฮอล์ 11 % โดยปริมาตร ได้เร็วขึ้น ช่วยลดเวลาการหมักให้สั้นลง และยังสามารถเพิ่มกำลังผลิตผลให้สูงขึ้นด้วย

3.3.5 <u>ศึกษาอัตราให้อากาศที่เหมาะสมแก่เซลยีสต์ย้อนกลับ</u> โดยทำการแปรค่าอัตราการให้อากาศแก่เซล เพื่อที่จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลยีสต์ให้เพิ่มขึ้น โดยแปรค่าอัตราการให้อากาศใหม่ดังนี้ 0.08 , 0.12 และ 0.16 vvm และหาอัตราการเจือจางที่เหมาะสมกับการหมักที่มีการนำเซลกลับมาใช้

3.4 <u>วิธีวิเคราะห์</u>

วิธีวิเคราะห์น้ำหมักโดยทำการดึงน้ำหมักด้วยสายดูดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยดูดจากท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร (ความยาวของปลายท่อจะอยู่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของน้ำหมักในคอลัมน์) เสียบกับรูที่เจาะไว้ตรง

กลางจุกยางซึ่งอุดไว้กับฝาปิดตอนบน ทำการดึงตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกคอลัมน์วันละ 2 ครั้ง โดยนำมาวิเคราะห์ ดังนี้

3.4.1 ความเข้มข้นของเซลยีสต์ โดยวิธีนับจำนวนเซลยีสต์ทั้งหมดจากกล้องจุลทรรศน์โดย (direct microscopic counts, DMC) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.

3.4.2 วัดสภาพความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter

3.4.3 หาปริมาณน้ำตาลในน้ำสับปะรดและน้ำหมัก โดยวัดในรูปปริมาณของแข็งรวมที่ละลายได้ (total soluble solid) ด้วยเครื่อง hand refractometer

3.4.4 ปริมาณเอธานอลในน้ำหมัก ใช้วิธีใน (Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists ,1980) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.