บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น G-25 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., U.S.A.

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T บริษัท Kubota Corporation, Japan.

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z 230 บริษัท Berthod Hermle, Germany.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-3100 บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160 บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องแกสโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 163 และชุดเครื่องมือตรวจวัดแบบ Flame - ionization Detector (FID) บริษัท Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan.

เครื่องวิเคราะห์ผล (Computer Integrator) รุ่น CR-4A CHROMATOPAC บริษัท Shimadzu, Ltd. Japan.

เครื่องชั่งแบบหยาบ (Eletronic Balance) รุ่น FX-3000 บริษัท A&D, Japan.

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Eletronic Balance) รุ่น FX-180A บริษัท A&D, Japan.

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PHM 82 Standard บริษัท Radio meter, Copenhagen, Denmark.

เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-Genie No. 2 บริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

เครื่องเขย่าสกัดสาร (shaker) รุ่น A-31 บริษัท Yamato Scientific Co. Ltd, Japan.

เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ รุ่น Elgastat UHQ II บริษัท Elga Ltd, England.

เครื่องวิเคราะห์ธาตุ (Elemental Analyzer) รุ่น NA 2000 บริษัท Fisons Instruments S.P.A., Italy.

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น MIR152 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd, Japan.

ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น MR-6650 บริษัท Hitachi, Ltd. Japan.

หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) รุ่น HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA.

2.1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรด 3, 5 -ไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟุริค	Mallinckrodt	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะซีติค	The East Asiatic	ประเทศไทย
กรดไฮโดรคลอริค	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ซีแทบ (CTAB)	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โซเดียมคาร์บอเนต	Fluka Chemika	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมัน
ไดคลอโรอีเธน	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพรพานอล	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
โบรโมฟีนอลบูล	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka Chemika	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารสกัดจากมอลต์	FIS	ประเทศไทย
เอธานอลสัมบูรณ์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เอธานอล	องค์การสุรา	ประเทศไทย
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ประเทศญี่ปุ่น
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เฮกเซมีน เอ็กซ์-100	เฮกซ่าไทยแลนด์	ประเทศไทย

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
FIS = Food Ingredients Specialities, Ltd.

2.2 กากน้ำตาลที่ใช้ในงานวิจัย

กากน้ำตาลที่ใช้เป็น blackstrap molasses โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลใน 4 จังหวัดดังนี้ คือ

โรงงานน้ำตาล	สถานที่ตั้ง	จังหวัด
อุตสาหกรรมหนองใหญ่	420 หมู่ 1 ต. หนองใหญ่	ชลบุรี
มิตรผล	109 หมู่ 10 อ. ด่านช้าง	สุพรรณบุรี
รวมเกษตรกรอุตสาหกรรม	99 หมู่ 10 อ. ภูเขียว	ชัยภูมิ
อุตสาหกรรมน้ำตาล ที. เอ็น.	11 หมู่ 2 อ. ท่าหลวง	ลพบุรี

โดยในการนำเสนอแต่ละโรงงานน้ำตาล จะนำเสนอเป็นรหัสตัวอักษรภาษาอังกฤษแทนดังนี้ คือ โรงงาน A, B, C และ D ตามลำดับ

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา และการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. จาก stock culture ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

2.3.2 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายยีสต์ *Saccharomyces* sp. ที่ใช้ในการทดลองโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก

(streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง (agar salant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวกที่ ก-1.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.3.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. จากข้อ 2.3.2 มาทำเป็นเซลล์แขวนลอยเติมน้ำขจัดไอออนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 2.5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งหลอดอาหารแข็งลาดเอียง แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผิวหน้าอาหารแข็งลาดเอียงออกให้หมด

2.3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

ปิเปตเซลล์แขวนลอยที่เตรียมได้ในข้อ 2.3.3.1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM (ภาคผนวกที่ ก-1.) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ควบคุมปริมาณเซลล์เริ่มต้น โดยการวัดค่าความขุ่นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ค่าความขุ่นมีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

2.3.3.3 การเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อหมักเอธานอลในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

หลังจากเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารกากน้ำตาล (ภาคผนวกที่ ก-2.) ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส

2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.4.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาลที่นำมาใช้ในการทดลอง

2.4.1.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล

นำตัวอย่างกากน้ำตาลที่ได้มาจากโรงงานน้ำตาล มาทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลแห้ง (dry weight) ปริมาณความชื้นต่อมวลแห้ง (dry basis) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลซูโครส และค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.5.4 ถึง 2.5.9

2.4.1.2 การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และซัลเฟอร์ (S) ด้วยเครื่อง Elemental Analyzer (NA 2000)

นำกากน้ำตาลแต่ละโรงงานมาวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ N, C, H และ S ด้วยเครื่อง NA 2000 ของบริษัท Fisons Instruments S.P.A. ประเทศอิตาลี ปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้วิเคราะห์แต่ละครั้งประมาณ 2 - 3 มิลลิกรัม

2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (QAC) ในกากน้ำตาล

2.4.2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในน้ำขจัดไอออน

เตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสาร QAC โดยใช้สารมาตรฐาน N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide ตามภาคผนวก ข-3. โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาหาค่าความยาวคลื่น (λmax) ที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.5.1 เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน

2.4.2.2 การศึกษาอิทธิพลที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของกากน้ำตาลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล

ชั่งตัวอย่างกากน้ำตาล 1.25, 2.5, 5 และ 10 กรัม (ตามน้ำหนักสุทธิที่คำนวณจาก % น้ำหนักมวลแห้งในตารางที่ 6) เติมสารละลายมาตรฐาน QAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10, 20, 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับด้วยน้ำขจัดไอออนให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายกากน้ำตาลเท่ากับ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร QAC ตามข้อ 2.5.1

2.4.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล โดยวิธี standard addition

ชั่งตัวอย่างกากน้ำตาล 10 กรัม (ตามน้ำหนักสุทธิที่คำนวณจาก % น้ำหนักมวลแห้งในตารางที่ 6) เติมสารละลายมาตรฐาน QAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับด้วยน้ำขจัดไอออนให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.5.1

2.4.3 การประเมินผลยับยั้งของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมต่อการเจริญ และการหมักเอธานอลด้วยยีสต์ *Saccharomyces* sp.

2.4.3.1 ศึกษาการเจริญ และการหมักเอธานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์ *Saccharomyces* sp.

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ YM (ภาคผนวก ก-1.) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3.2 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วถ่ายหัวเชื้อมาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอธานอล ตามภาคผนวกที่ ก-2. ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปิดจุกด้วยสำลี โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพ static culture เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือและปริมาณเอธานอลที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.4.3.2 ศึกษาผลของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมต่อการเจริญและการหมักเอธานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ YM (ภาคผนวก ก-1.) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3.2 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วถ่ายหัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอธานอล ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปิดจุกด้วยสำลี ตามภาคผนวกที่ ก-2. เติมสาร QAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารกากน้ำตาลเท่ากับ 0, 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพ static culture เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ทำการศึกษาการเจริญของยีสต์ โดยนำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณเอธานอลที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.4.4 การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม

2.4.4.1 ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในน้ำขจัดไอออน (model solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน QAC (ภาคผนวกที่ ข-3.) ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วยน้ำขจัดไอออนในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50.0

มิลลิลิตรต่อขวด ปิดปากขวดด้วยแผ่นอลูมินัม จากนั้นนำไปผ่านความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ควบคุมอุณหภูมิที่ 110 องศาเซลเซียส (ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) และที่ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) นาน 15 นาที และ 30 นาที โดยใช้น้ำขจัดไอออนที่เติมสาร QAC แต่ไม่ผ่านความร้อนเป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในน้ำขจัดไอออน ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.1

2.4.4.2 ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล

ชั่งกากน้ำตาลตามน้ำหนักสุทธิ 10 กรัม (คำนวณจาก % น้ำหนักมวลแห้งในตารางที่ 6) เติมสารละลายมาตรฐาน QAC ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดปากขวดด้วยแผ่นอลูมินัม จากนั้นนำไปผ่านความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอ ควบคุมอุณหภูมิที่ 110 องศาเซลเซียส (ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) และที่ 121 องศาเซลเซียส (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) นาน 15 นาที และ 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.1

2.4.5 การศึกษาการลดปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาลโดยการปั่นแยกตะกอนออก

ชั่งกากน้ำตาลตามน้ำหนักสุทธิ 10 กรัม (คำนวณจาก % น้ำหนักมวลแห้งในตารางที่ 6) เจือจางด้วยน้ำขจัดไอออน ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.1

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (A.O.A.C., 1997)

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก (separator) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโบรโมฟีนอลบลู 0.04% (w/v) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมไดคลอโรอีเธน (dichloroethane) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยก นำไปเขย่าเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้

สารละลายแยกชั้น ถ่ายสารละลายชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนของไดคลอโรอีเธนไปยังกรวยแยกอีกอันหนึ่ง เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1% (w/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น สังเกตสารละลายส่วนชั้นล่างจะเกิดสีน้ำเงินของ quaternary base ไขสารละลายชั้นล่างไปยัง glasstoppered flask เติมโซเดียมซัลเฟต 0.2 - 0.4 กรัม เพื่อดูดน้ำ นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร QAC กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 610 นาโนเมตร ใช้ช่วงความเข้มข้นของสาร QAC 2 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.5.2 การวัดการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมักจากข้อ 2.3.3.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในกระทงอลูมินัมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในเดซิกเคเตอร์ (desiccator) จนเย็น ชั่งน้ำหนักและเมื่อหักลบน้ำหนักกระทงอลูมินัมฟอยล์ออกจากน้ำหนักที่ได้ น้ำหนักที่เหลือคือค่าน้ำหนักแห้งของยีสต์ หาค่าน้ำหนักแห้งที่ได้เป็นกรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ออกแล้ว นำไปวิเคราะห์หาปริมาณการผลิตเอธานอลต่อไป

2.5.3 การนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด จากกล้องจุลทรรศน์โดยตรง (direct microscopic counts, DMC)

เตรียม hemacytometer ที่สะอาด วาง cover slip บน hemacytometer นำน้ำหมักจากข้อ 2.3.3.3 เจือจางด้วยน้ำขจัดไอออนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้มีปริมาณเซลล์แขวนลอยพอเหมาะ ปิเปต 1.0 มิลลิลิตร ลงบนขอบของ cover slip ทั้ง 2 ข้าง พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ นำไปนับจำนวนเซลล์ยีสต์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ปรับโฟกัสให้เห็นตารางเล็ก ๆ ใน hemacytometer ซึ่งใน 1 ช่อง จะมีตารางเล็ก ๆ ภายในอีก 16 ช่อง ให้นับทั้งหมด 5 ช่อง อาจนับในแนวเส้นทะแยงมุมด้านใดด้านหนึ่ง ถ้าหากมีเซลล์ยีสต์อยู่ทับเส้นระหว่างช่องให้นับเซลล์ทุกเซลล์ที่ทับอยู่บนเส้นทางซ้าย และเส้นของสี่เหลี่ยม โดยจะไม่นับเซลล์ยีสต์ที่ทับบนเส้นขวา และเส้นล่างของสี่เหลี่ยม

โดย X คือ จำนวนเซลล์ยีสต์ที่นับได้ในปริมาตร $\frac{1}{50}$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.5.4 การวิเคราะห์หาน้ำหนักมวลแห้ง (Dry weight)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในกระทงอลูมินัมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบที่ความร้อน 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักและนำไปลบกับน้ำหนักกระทงอลูมินัมฟอยล์ก็จะทราบค่าน้ำหนักแห้ง นำมาคิด % (w/w) น้ำหนักมวลแห้ง ดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%) (ร้อยละโดยน้ำหนักมวลเปียก)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียก - น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักเปียก}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักมวลแห้ง (\%) (ร้อยละโดยน้ำหนักมวลเปียก)} = 100 - \text{ปริมาณความชื้น (\%)}$$

2.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นต่อมวลแห้ง (Dry basis)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในกระทงอลูมินัมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งในตู้อบที่ความร้อน 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นำไปชั่งหาน้ำหนักและนำไปลบกับน้ำหนักกระทงอลูมินัมฟอยล์ก็จะทราบค่าน้ำหนักแห้ง นำมาคิด % (w/w) โดยร้อยละน้ำหนักมวลแห้ง ดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้นต่อมวลแห้ง (\%) (ร้อยละโดยน้ำหนักมวลแห้)} = \frac{\text{น้ำหนักเปียก - น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักแห้ง}} \times 100$$

2.5.6 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) (สันติ เหมศรี, 2539)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสลงในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4 (ภาคผนวกที่ ข-2.) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมในตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดในตัวอย่าง ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.5.7

กราฟมาตรฐานใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1 - 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น โดยใช้น้ำขจัดไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตามตารางที่ ง-1 และรูปที่ ง-1 ในภาคผนวกที่ ง. ค่าการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และเมื่อนำมาลบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะได้เป็นปริมาณน้ำตาลซูโครส

2.5.7 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยกรด 3, 5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld อ้างถึงใน สันติ เหมศรี, 2539)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร (ภาคผนวกที่ ข-1.) เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 5 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำที่ขจัดไอออน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัดไอออนเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 1.0 กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ ง-2 และรูปที่ ง-2 ในภาคผนวกที่ ง.

2.5.8 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง

ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

2.5.9 การวิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน (N) คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และซัลเฟต (S)

ใช้เครื่องวิเคราะห์ธาตุ Elemental Analyzer (NA 2000)

2.5.10 การวิเคราะห์ปริมาณเอธานอลโดยใช้เครื่องแกสโครมาโทกราฟฟี (Komagata and Ohmono, 1984)

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ยีสต์ออก ปิเปตส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเกลียว เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) โพรพานอล (n-propanal) ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ฉีดตัวอย่างสารละลายของผสม 1.0 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแกสโครมาโทกราฟฟี (ภาคผนวกที่ ข-4.) คำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ ข-1. ผลการวิเคราะห์จะบอกปริมาณเอธานอลโดยน้ำหนัก ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC เป็นดังนี้

ชนิดสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์	:	10% Polyethylene glycol 20M ขนาด 60-80 mesh เคลือบบน Shimalite (silica oxide)
ขนาดของคอลัมน์แก้ว	:	เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.2 มิลลิเมตร ยาว 1.5 เมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	:	60 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิอินเจกเตอร์	:	150 องศาเซลเซียส
ดีเทคเตอร์	:	FID (flame-ionize detector)
แกสพา	:	ไนโตรเจน 30 มิลลิลิตรต่อนาที