บทที่ 4

การทดลอง

4.1 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการผลิตเอทานอลเป็นเครื่องหมักแบบคอลัมน์ที่ได้ปรับปรุงแก้ไขจากงานก่อน ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

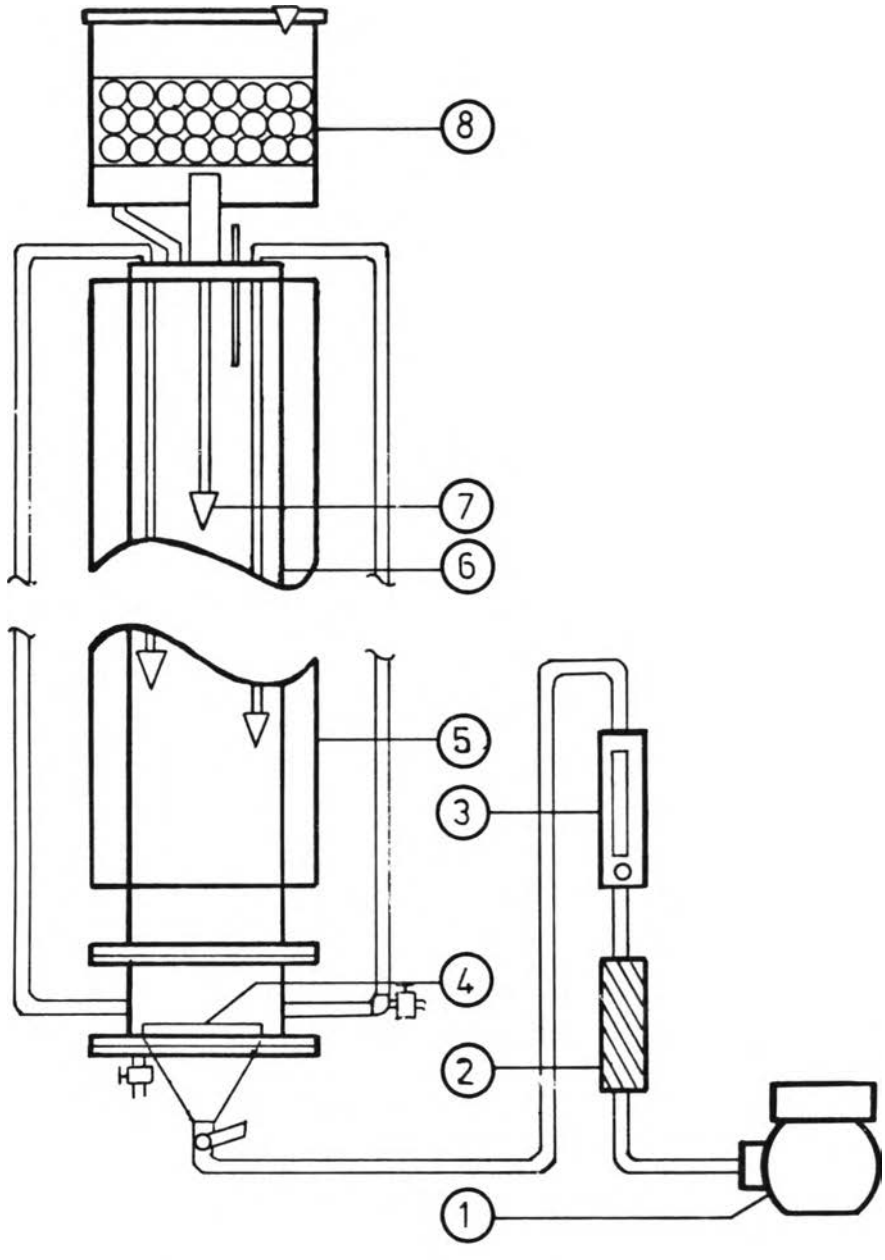
1. เครื่องพ่นอากาศและตัวกระจายอากาศ
2. คอลัมน์สำหรับหมักและระบบหล่อเย็น
3. ระบบการป้อนย้อนกลับ
4. ระบบกำจัดฟอง

4.1.1 เครื่องพ่นอากาศและตัวกระจายอากาศ

ประกอบด้วย เครื่องอัดอากาศ (หมายเลข 1) ซึ่งจะให้อัตราการไหลของอากาศคงที่ โดยมีเครื่องปรับความดันติดอยู่กับตัวเครื่อง อากาศจะไหลผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศ (หมายเลข 2) และเข้าเครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ (หมายเลข 3) แล้วผ่านเข้าตัวกระจาย (หมายเลข 4) ซึ่งตั้งอยู่ตอนล่างของคอลัมน์ ตัวกระจายอากาศทำด้วยตะแกรงสเตนเลสกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร

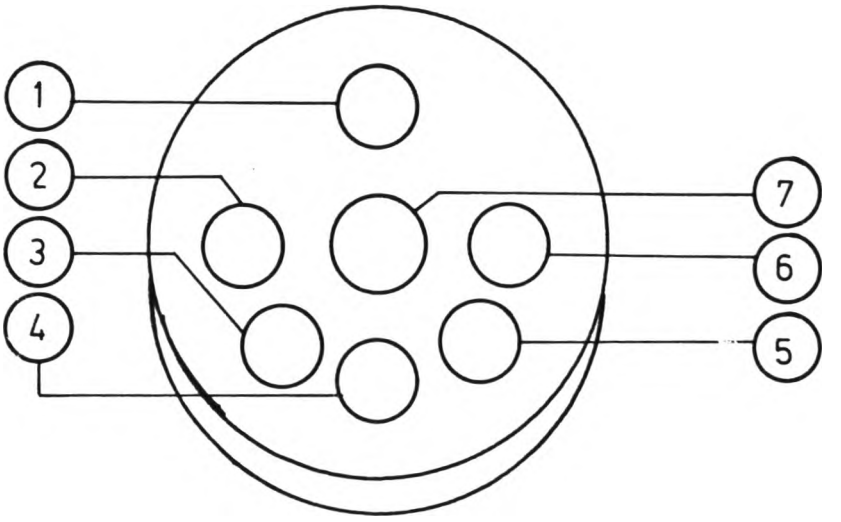
4.1.2 คอลัมน์สำหรับหมักและระบบหล่อเย็น

คอลัมน์ที่ใช้หมัก (หมายเลข 6) ทำด้วยพลาสติกใสชนิดที่ทนต่อสารเคมีได้ดี ไม่บิดงอเมื่อถูกความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 8 เซ็นติเมตร สูง 120 เซนติเมตร 7 รู (รูปที่ 4.2) รูที่ 2, 4 และ 6 ใช้สำหรับต่อท่อในระบบการป้อนย้อนกลับ (หมายเลข 7) รูที่ 7 สำหรับใส่ฟองที่ลอยออกไหลเข้าสู่ระบบกำจัดฟอง (หมายเลข 8) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซ็นติเมตร และไหลกลับเข้าสู่คอลัมน์ที่รูที่ 1 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซ็นติเมตร รูที่ 5 สำหรับเสียบเทอร์โมมิเตอร์เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในคอลัมน์ รูที่ 3 สำหรับเติมกรด

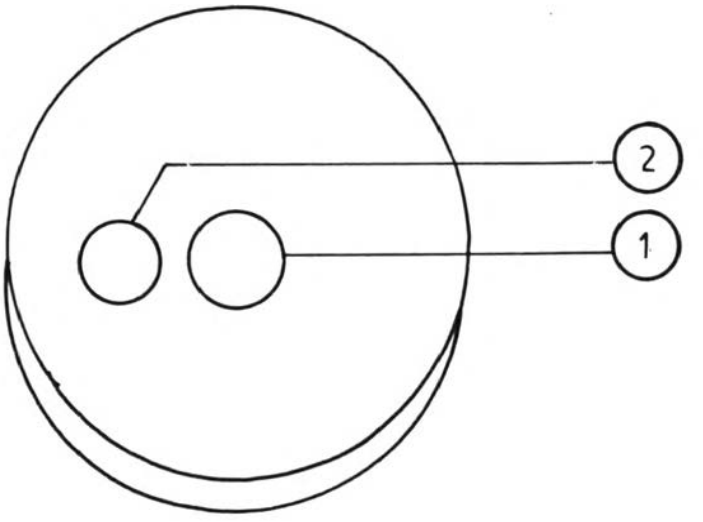


รูปที่ 4-1 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องสกัดแบบคอลัมน์

1	เครื่องอัดอากาศ	5	ระบบหล่อเย็น
2	เครื่องกรองอากาศ	6	ตัวคอลัมน์
3	เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ	7	ระบบไหลเปลี่ยนย้อนกลับ
4	หัวกระจายอากาศ	8	ระบบกันฟองเข้า



ฝาปิดตอนบน



ฝาปิดตอนล่าง

รูปที่ 4-2 แสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของรูที่เจาะบนฝาปิด

หรือด่าง ที่ปลายล่างของคอลัมน์ปิดและเจาะรูไว้ 2 รู (รูปที่ 4-2) รูแรกสำหรับติดตั้งตัวกระจายอากาศ (หมายเลข 4) รูที่ 2 มีท่อต่อออกและมีวาล์วปิดเปิดที่ปลายท่อ เพื่อใช้ในการเติมสารอาหารและถ่ายผลิตภัณฑ์ออกภายหลังการหมัก ส่วนปลายล่างของด้านข้างของคอลัมน์จะเจาะรูขนาด 0.8 เซนติเมตร มีวาล์วปิดเปิดที่ปลายท่อใช้ในการชักตัวอย่าง รอบ ๆ คอลัมน์จะมีระบบหล่อเย็น (หมายเลข 5) ทำด้วยพลาสติกใสมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 15 x 15 x 100 เซนติเมตร

4.1.3 ระบบการป้อนย้อนกลับ

การป้อนย้อนกลับทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของน้ำหมักระหว่างตอนล่างและตอนบนของคอลัมน์ และในคอลัมน์กับท่อป้อนย้อนกลับที่ฝาปิดปลายบนของคอลัมน์จะมีท่อขนาดเดียวกับรูหมายเลข 2, 4 และ 6 แต่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.7 เซนติเมตร เสียบอยู่ และที่ปลายของท่อทั้งสามจะยึดติดกับกรวย ทั้งท่อและกรวยทำด้วยสเตนเลส ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร กรวยทั้งสามนี้จะทำหน้าที่กันไม่ให้อากาศไหลเข้าท่อย้อนกลับ ซึ่งถ้ามีอากาศอยู่จะทำให้การไหลชงักได้ และท่อทั้งสามจะยื่นลงมาลึก 30, 50 และ 70 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนที่โผล่จากฝาปิดด้านบนของตัวคอลัมน์จะเป็นท่อหึ่งอ และจะแยกออกเป็น 2 ทาง ทางหนึ่งมีท่อต่อออกและมีวาล์วปิดเปิดที่ปลายท่อ สำหรับทำให้เริ่มเกิดการย้อนกลับ ส่วนอีกทางหนึ่งขนานกับตัวคอลัมน์ลงมาจนถึงตอนล่าง และเจาะทะลุเข้าทางด้านข้างของตัวคอลัมน์

4.1.4 ระบบกำจัดฟอง

อุปกรณ์กำจัดฟอง (หมายเลข 8) ทำด้วยพลาสติกใสมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 15 x 15 x 40 เซนติเมตร ภายในตะแกรงสเตนเลสซึ่งบรรจุลูกพลาสติกทรงกลม เมื่อฟองที่ลอยออกจากคอลัมน์ก็จะกระทบกับลูกพลาสติก ทำให้ฟองแตกสลายและไหลกลับเข้าสู่คอลัมน์ทางรูที่ 1 ทำให้ไม่ต้องใช้สารกำจัดฟอง

4.2 การเตรียมการหมัก

4.2.1 ยีสต์

ในการศึกษานี้ได้ใช้ยีสต์ Saccharomyces ellipsoideus และSaccharomyces

cerevisiae ในรูปยีลต์บริสุทธิ์นำมาถ่ายเชื้อเก็บไว้ใน โปเตโต้ เด็กโตรส เอการ์ (Potato Dextose Agar) และเก็บไว้ในตู้เย็น 10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4.2.2 น้ำสับปะรด

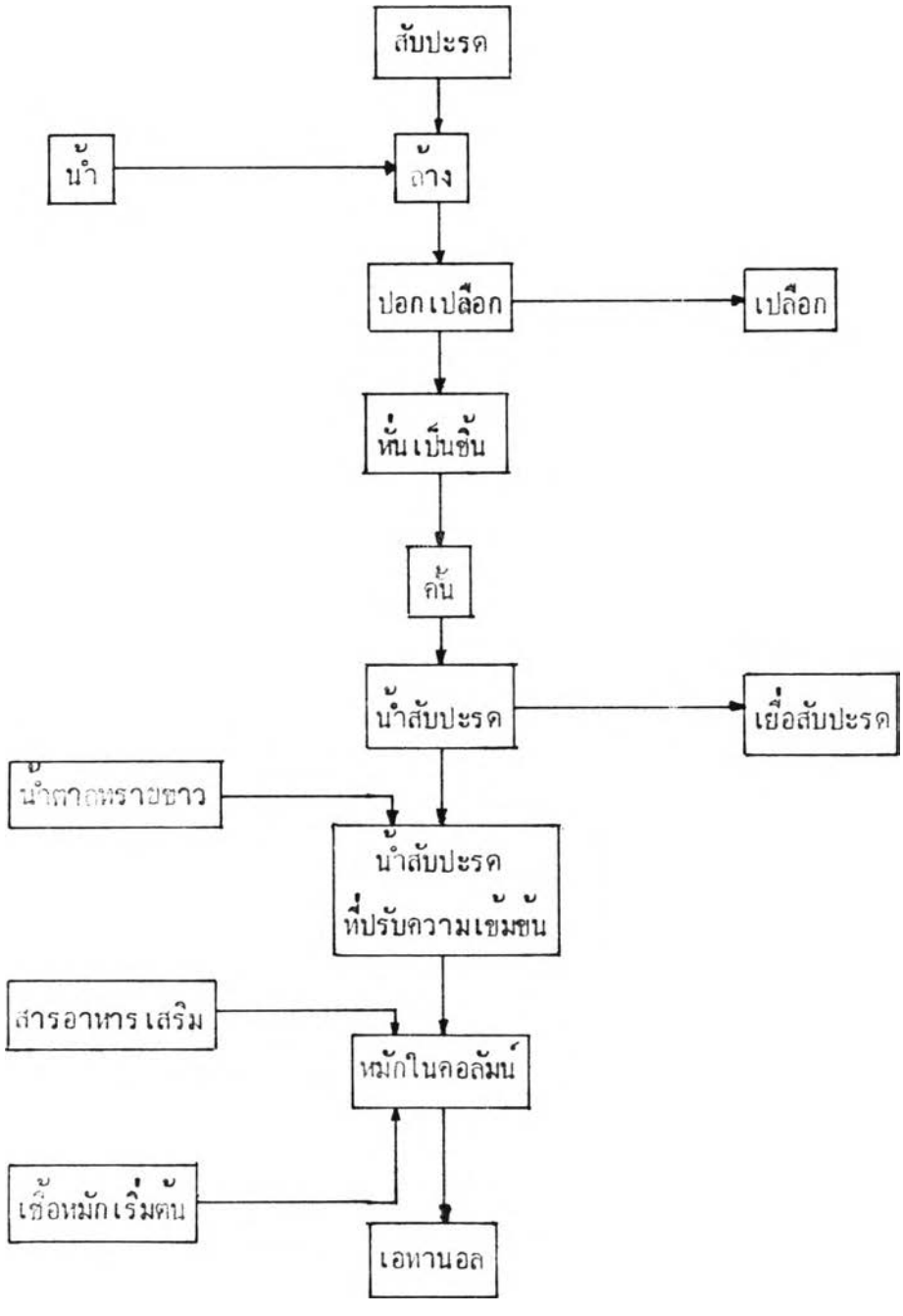
ใช้สับปะรดสุกได้ที่เมื่อจะให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด นำมาล้างและปอกเปลือก แล้วสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำเข้าสู่เครื่องบีบ เมื่อแยกน้ำสับปะรดออกจากส่วนเนื้อของสับปะรด หลังจากนั้นนำมาผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง น้ำสับปะรดที่ได้ วัดค่าความเข้มข้นของน้ำตาล โดยใช้เครื่องรีแฟคโตมิเตอร์ จะมีค่าอยู่ระหว่าง 13-14 องศาบริกซ์ และวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยตรงที่แน่นอนอีกครั้งตามวิธีของ Lano-Ennon(Pearson,1970) เมื่อใช้เป็นสารอาหารในการผลิตเอทานอล (ดูรูปที่ 4-3)

4.2.3 เชื้อหมักเริ่มต้น

ได้ใช้เชื้อหมักเริ่มต้น 5% โดยปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด ในการเตรียมใช้น้ำสับปะรดตามหัวข้อ 4.2.2 โดยใช้น้ำตาลเข้มข้นน้อยกว่าความเข้มข้นน้ำตาลที่ใช้ในการหมักประมาณ 10% บรรจุใส่ในขวดแก้วเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด และนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารอาหารเสริมซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นแต่ละครั้งโดยบ่มไว้มีอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายเชื้อลงไปในขวดแก้วเขย่า ทั้งการเติมอาหารเสริมและการถ่ายเชื้อต้องทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 22 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้กับการผลิตเอทานอลในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ต่อไป

4.2.4 เครื่องหมักและอื่น ๆ

คอลัมน์พลาสติก หัวกระจายอากาศ และท่อต่าง ๆ ของเครื่องหมัก ทำให้ปราศจากเชื้อทำโดยล้างด้วยน้ำยา ทีโพ เป็นเวลา 30 นาที น้ำ และน้ำที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้ว โดยล้าง 2 ครั้ง เครื่องกรองอากาศซึ่งเป็นแก้วบรรจุสำลีอยู่ภายใน ทำการฆ่าเชื้อด้วยการอบด้วยความร้อนที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และจัดสภาพการหมักให้เหมาะสมกับเชื้อยีสต์จะเจริญได้ดี และเป็นสภาพที่เชื้ออื่น ๆ เจริญแข่งขันไม่ได้ โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ในตอนเริ่มต้นสูง



รูปที่ 4-3 ขั้นตอนในการเตรียมน้ำสับปะรดและการหมัก

และปรับสภาพของน้ำหมักให้มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 4.5

4.3 วิธีการทดลอง

หลังจากได้ปรับความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำสับปะรด ความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 4.5 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 10% และเติมสารอาหารเสริม เริ่มการทดลองจะเปิดให้อากาศปลอดเชื้อผ่านหัวกระจายอากาศ ในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที ไว้ก่อน แล้วเติมสารอาหารเหลวน้ำสับปะรดลงในคอลัมน์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำสับปะรดไหลเข้าไปในหัวกระจายอากาศ ในขณะเดียวกันทำการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นทางด้านการเติมกรดหรือด่าง จนได้ปริมาตรครบ 6 ลิตร ดูดอากาศออกจากท่อปิดย้อนกลับทั้งสาม (หมายเลข 7 รูปที่ 4-1) ทางวาล์วปิดเปิด เพื่อให้น้ำหมักเริ่มไหลวน เมื่อน้ำหมักไหลวนแล้วรีบปิดวาล์วทันที เพื่อไม่ให้อากาศเข้าไปอีก ซึ่งจะทำให้การไหลวนหยุดชะงักได้ เริ่มจับเวลาพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ปรับความเป็นกรด-ด่างใหม่ให้ได้ 4.5 ในการถ่ายเชื้อหมักเริ่มต้นลงในอาหารเหลวน้ำสับปะรดโดยให้ได้ค่าสภาพการดูดกลืนแสงประมาณ 45 เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยูวี ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร หรือจำนวน เซลล์ยีสต์ที่นับได้ 490 ล้านตัวใน 1 มิลลิลิตรของเชื้อหมักเริ่มต้น

ในการทดลองฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างการให้อากาศหรือในขณะทำการหมักแบบไม่ให้อากาศจะถูกกำจัดฟองให้หมดลงด้วยอุปกรณ์กำจัดฟอง (หมายเลข 8 รูปที่ 4-1) และในระหว่างการหมักสารอาหารถูกใช้ไป ระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลง ดังนั้นจำเป็นต้องเติมด่างลงไปเป็นช่วง ๆ เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักให้ได้ 4.5 ทุก ๆ 2 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

4.4 ขั้นตอนในการทดลอง

ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

4.4.1 การทดลองถึงชนิดและปริมาณของสารอาหารเสริมต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ S.ellipsoideus ที่ใช้ในขวดแก้วเขย่า เพื่อที่จะนำสูตร

สารอาหารที่ให้ผลดีที่สุดไปใช้หมักในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ต่อไป ได้ใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ (ปรับความเข้มข้นน้ำตาลด้วยน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์) เป็นสารอาหาร ขวดละ 300 มิลลิลิตร ปิดจุกขวดด้วยสำลีและหุ้มรอบนอกด้วยแผ่นอลูมิเนียมบางอีกชั้นหนึ่ง นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง เติมสารอาหารเสริมซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นเช่นกัน และถ่ายเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อที่กำลังเจริญเติบโตดีลงไป (ขวดละ 1 หลอด) การถ่ายเชื้อยีสต์ทำโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ **ใช้สวดเขี่ยเชื้อให้เซลล์ยีสต์กระจายตัวแล้วลอยแขวนในน้ำกลั่น** จึงเทน้ำกลั่นที่มีเชื้อยีสต์ลงในขวดแก้วเขย่า หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหมักต่อโดยไม่เขย่าอีก 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทั้งการเติมสารอาหารเสริมและการถ่ายเชื้อต้องทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ เกลือแร่ที่ใช้เป็นสารอาหารเสริมในการทดลองได้ใช้สารหลายอย่างผสมลงในสูตรสารอาหาร ซึ่งจะเติมในรูปของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกเนเซียม ในปริมาณต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4-1 แล้วหมักกับเชื้อยีสต์โดยใช้เวลาการหมักเท่า ๆ กัน และจำนวนเชื้อหมักเริ่มต้นเท่า ๆ กัน

4.4.2 การทดลองผลิตเอทานอลในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดไม่ต่อเนื่อง ได้แบ่งออกเป็น

4.4.2.1 การทดลองเพื่อทดสอบอิทธิพลของห่อป้อนย้อนกลับที่มีผลต่อขบวนการหมัก โดยทำการเปรียบเทียบอิทธิพลการมีและไม่มีการไหลหมุนเวียนของน้ำหมักในห่อป้อนย้อนกลับต่อการทดลอง โดยใช้เชื้อหมักเริ่มต้น 5% ของปริมาตรน้ำหมักทั้งหมด ปริมาณการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในช่วงแรกของการหมัก (นิคม ติปะวาโร, 2523) สำหรับการหมักแบบให้อากาศ และเติมสารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต และ ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับขบวนการหมักที่เติมสารอาหารเสริม ดำเนินการทดลองโดย

4.4.2.1.1 ได้ทำการเปรียบเทียบการหมักแบบให้และไม่ให้อากาศเลย เพื่อแสดงให้เห็นว่าการหมักในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ไม่ใช่การหมักในเครื่องหมักแบบธรรมดา โดยดูความแตกต่างในการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ ในช่วงแรกของการหมักเมื่อใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ เป็นสารอาหาร

ตารางที่ 4-1 แสดงชนิดและปริมาณสารอาหารเสริมต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบสูตรสารอาหารในขวดแก้วเรย่า

ส่วนประกอบ	สูตรสารอาหารที่										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
น้ำสับปะรด (20 องศาบริกซ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.01% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.01% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ยูเรีย, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

+ เติมในสูตรสารอาหาร

- ไม่เติมในสูตรสารอาหาร

4.4.2.1.2 ขบวนการหมักเมื่อทำให้น้ำหมักไหลหมุนเวียนในท่อป้อนย้อนกลับ เมื่อเติมและไม่เติมสารอาหารเสริม โดยใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 14 องศาบริกซ์ เป็นสารอาหาร

4.4.2.1.3 ทำเช่นเดียวกับ 4.4.2.1.2 แต่ไม่ทำให้น้ำหมักไหลหมุนเวียนในท่อป้อนย้อนกลับ

4.4.2.2 การทดลองถึงชนิดและปริมาณของสารอาหารเสริมต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ S.ellipsoideus ที่ใช้ ได้เลือกสภาวะที่ดีที่สุดจากขบวนการหมักดังกล่าวมาแล้วข้างต้น ได้ใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 14 องศาบริกซ์ ล้วน ๆ เป็นสารอาหาร เกลือแร่ที่ใช้เป็นสารอาหารเสริมในการทดลองนี้ ได้ใช้สารหลายชนิดเติมลงในสูตรสารอาหาร ซึ่งเติมในรูปของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแมกเนเซี่ยม ในปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วหมักกับเชื้อยีสต์โดยใช้เวลาการหมักเท่า ๆ กัน และจำนวนเชื้อหมักเริ่มต้นเท่า ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 4-2

4.4.2.3 การทดลองถึงปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำสับปะรดที่เหมาะสมที่จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยใช้ระยะเวลาพอสมควร (ที่จะให้อัตราส่วนของเอทานอลต่อระยะเวลาหมักสูง) จากการทดลองตามหัวข้อ 4.4.2.2 ทำให้สามารถเลือกชนิดและปริมาณของสารอาหารเสริมที่เหมาะสมได้ ดังนั้นได้เลือก แอมโมเนียม ซัลเฟต ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และแมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อให้อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ ในช่วงแรกของการทดลอง ในการทดลองนี้ ได้ใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล ดังนี้ 14, 18, 20, 25 และ 30 องศาบริกซ์ (ปรับความเข้มข้นน้ำตาลด้วยน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์) เป็นสารอาหาร ซึ่งไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ทั้งสิ้น

4.4.2.4 การทดลองถึงปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลได้จากการเจือจางน้ำสับปะรดเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยใช้ระยะเวลาพอสมควร เมื่อใช้น้ำสับปะรดเข้มข้น ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาล 60 องศาบริกซ์ จากโรงงานอาหารสยาม นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาล 18, 20 และ 25 องศาบริกซ์ตามต้องการ เป็นสารอาหาร

ตารางที่ 4-2 แสดงชนิดและปริมาณสารอาหารเสริมต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบสูตรสารอาหารในเครื่องหมักแบบคอลัมภ์

ส่วนประกอบ	สูตรสารอาหารที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
น้ำสับปะรด (14 องศาบริกซ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.01% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
แอมโมเนียม ซัลเฟต, (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
แอมโมเนียม คลอไรด์, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.01% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
ยูเรีย, (0.05% น้ำหนักต่อปริมาตร)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
แมกเนีเซียม ซัลเฟต, (0.01% น้ำหนักต่อปริมาตร)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ เติมในสูตรสารอาหาร - ไม่เติมในสูตรสารอาหาร

สารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต และ ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และ แมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ในช่วงแรกของการทดลอง

4.4.2.5 การทดลองเพิ่มระยะเวลาในการป้อนอากาศ สำหรับน้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงกว่า 20 องศาบริกซ์ ในการทดลองนี้ ได้ใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 25 องศาบริกซ์ เป็นสารอาหาร สารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต และ ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และแมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เวลาในการป้อนอากาศ 4, 5 และ 6 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ให้มากเพียงพอต่อการหมักในช่วงแรกของการทดลอง

4.4.2.6 การทดลองเมื่อดูเชื้อยีสต์ที่ให้เอทานอลสูงอื่น ๆ เท่าที่จะหาได้เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่เดิม โดยใช้สภาวะการหมักที่ดีที่สุดของเชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่เดิมเป็นเกณฑ์ จากการทดลองตามหัวข้อ 4.4.2.3 ทำให้สามารถเลือกสภาวะการหมักที่ดีที่สุดของเชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่เดิมได้ ดังนั้นได้เลือกใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์เป็นสารอาหาร สารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต, ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และแมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ในช่วงแรกของทดลอง ในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae(S_{90}) จากโรงงานสุราอยุธยา เป็นตัวเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ที่ใช้อยู่เดิม คือ Saccharomyces ellipsoideus (K_1) จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.4.2.7 การทดลองเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ ในการเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น 5% ของ 6 ลิตร ในคอลัมน์นั้นจะใช้น้ำสับปะรดที่มีน้ำตาลเข้มข้นน้อยกว่า 20 องศาบริกซ์ ประมาณ 10% เป็นสารอาหาร สารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และ แมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนัก

ต่อปริมาตร) ทั้งสารอาหารและสารอาหารเสริมที่ใช้เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากทิ้งไว้ในตู้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ถ่ายเชื้อยีสต์จากหลอดอาหารวุ้นที่กำลังเจริญเติบโตดีลงไป ทำโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทลงในหลอดอาหารวุ้นใช้ลวดเขี่ยเชื้อยีสต์ให้เซลล์ยีสต์กระจายตัวแล้วลอยแขวนในน้ำกลั่น จึงเทน้ำกลั่นที่มีเชื้อยีสต์ลงในสารอาหารเหลวน้ำสับปะรด (ปริมาณที่ใช้เชื้อยีสต์จำนวน 10 หลอด) ทั้งการเติมสารอาหารเสริมและถ่ายเชื้อยีสต์ต้องทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายลงในคอลัมน์ แล้วป้อนอากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เวลาในการให้อากาศ 4 และ 8 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ในช่วงแรกของการทดลอง ส่วนสารอาหารเหลวน้ำสับปะรด ความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ ที่เหลือถ่ายลงสู่ถังเก็บ เพื่อเตรียมถ่ายเข้าสู่คอลัมน์ ในช่วงการหมักแบบไม่ให้อากาศต่อไป

4.4.3 การทดลองผลิตเอทานอลในเครื่องหมักแบบคอลัมน์ชนิดกึ่งต่อเนื่อง

4.4.3.1 การทดลองเพื่อหาปริมาณการถ่ายเทน้ำหมักออกแล้วเติมอาหารเหลวลงไปทดแทนในปริมาณเดียวกัน โดยใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ เป็นสารอาหาร สารอาหารเสริมประกอบด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต, ไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต อย่างละ 0.05% และแมกเนเซียม ซัลเฟต 0.01% (น้ำหนักต่อปริมาตร) อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมัก ต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ในช่วงแรกของการทดลอง แล้วทำการหมักแบบไม่ให้อากาศต่อ จนถึงการหมักชั่วโมงที่ 16 เริ่มถ่ายเทน้ำหมักออกแล้วเติมอาหารเหลวลงไปทดแทนในปริมาณเดียวกัน (พิจารณาจากการทดลองในขบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง) ในปริมาณ 25%, 50% และ 75% ซึ่งจะใช้น้ำสับปะรดมีความเข้มข้นน้ำตาลเช่นเดียวกันนี้ทดแทน หลังจากเติมอาหารลงไปทดแทนแล้วรีบดึงน้ำหมักออกมาเพื่อหาค่าต่าง ๆ

4.4.3.2 เลือกอัตราการถ่ายเทและทดแทนน้ำหมักที่เหมาะสมจากการทดลองตามหัวข้อ 4.4.3.1 คือ 25% ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับ 4.4.3.1 แต่เริ่มถ่ายเทน้ำหมักออกในชั่วโมงที่ 13 และ 19 ซึ่งจะใช้น้ำสับปะรดมีความเข้มข้นน้ำตาล 20 องศาบริกซ์ทดแทน นอกจากนี้ยังได้ทำการทดแทนน้ำหมักด้วยความเข้มข้นน้ำตาล 15 องศาบริกซ์ ในชั่วโมงที่ 13 ของการถ่ายเทด้วย

4.4.3.3 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับ 4.4.3.1 แต่ได้เปลี่ยนน้ำสับปะรดที่มี

ความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 18 องศาบริกซ์เป็นสารอาหาร ได้เริ่มการถ่ายเทและทดแทนน้ำหมักในชั่วโมงที่ 13 และ 16 ของการหมักในปริมาณ 25% ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเช่นเดียวกันนี้ทดแทน

4.4.3.4 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับ 4.4.3.1 แต่ได้เปลี่ยนน้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเป็น 14 องศาบริกซ์ เป็นสารอาหาร ได้เริ่มการถ่ายเทและทดแทนน้ำหมักในชั่วโมงที่ 13 ของการหมักในปริมาณ 25% ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นน้ำตาล 14 และ 18 องศาบริกซ์ทดแทน

4.5 วิธีการวิเคราะห์

4.5.1 ปริมาณของแข็งรวมที่ละลายได้ (Total soluble soiid)
ตรวจหาปริมาณโดยใช้ Hand Brix Refractometer
อ่านค่าเป็นองศาบริกซ์

4.5.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)
ตรวจวัดโดยใช้ pH-meter

4.5.3 ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ ตรวจโดย

4.5.3.1 วัดค่าสภาพการดูดกลืนแสง (Absorbance)
ใช้วิธีของ Vananuvat and Kinsella, 1975
(ดูวิธีในภาคผนวก ก)

4.5.3.2 จำนวนเชื้อยีสต์ที่นับได้
ใช้วิธีตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากกล้องจุลทรรศน์โดยตรง
(ดูวิธีในภาคผนวก ก)

4.5.4 ปริมาณน้ำตาลในน้ำสับปะรดและในน้ำหมัก
ใช้วิธีของ Lane-Ennon (Pearson, 1970)
(ดูวิธีในภาคผนวก ก)

4.5.5 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เอทานอล) ในน้ำหมัก
ใช้วิธีใน Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists,1980 (ดูวิธีในภาคผนวก ก)