

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1 อุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้แบ่งเป็น 2 พวกคือ

1. เครื่องหมักเอทานอล
2. เครื่องหมักน้ำส้มสายชู

##### 3.1.1 เครื่องหมักเอทานอล

เป็นเครื่องหมักแบบคอส้มน์ ใช้วิธีการหมักแบบวิทยานิพนธ์ของ  
นิคม (10) ดังรูปที่ 7 จะสามารถผลิตเอทานอลได้ 30 ลิตรต่อครั้ง

##### 3.1.2 เครื่องหมักน้ำส้มสายชู

เครื่องมือที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูมี 2 แบบ

##### 3.1.2.1 เครื่องหมักแบบแพคเบตคอส้มน์เดี่ยว

ก. เครื่องหมักแบบหนึ่งชั้น (6)

ดังรูปที่ 8 ซึ่งประกอบด้วย

- คอส้มน์ ทำด้วยพีวีซีใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง  
ภายใน 8.4 เซนติเมตร สูง 100 เซนติเมตร จุน้ำหมักที่ใช้ในการหมักได้ 5 ลิตร  
ด้านล่างมีระบบ กาลังน้ำ (siphoning system) และหัวกระจายอากาศ ด้านบนมี  
หัวกระจายน้ำหมักและทางให้อากาศออก และติดกับตัวคอส้มน์จะมีที่สำหรับสับไอของ  
เอทานอล และน้ำส้มสายชู ภายในคอส้มน์จะมีตะแกรงเพื่อรองรับแพคเบต ส่วน  
แพคเบตมีลักษณะรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร จำนวน 360 ลูก

- หัวกระจายอากาศ และหัวกระจายน้ำหมัก



- ระบบกาสก์น้ำ ดังรูป

11 ก. ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับเครื่องหมักแบบหนึ่งชั้น และน้ำหมักจะไหลออกมาเป็น  
สังหะ

- ระบบท่อน้ำล้น (overflow system) ดังรูปที่

11 ข. น้ำหมักจะไหลออกมาต่อเนื่อง และมีน้ำหมักขังในคอสมันต์ตลอดเวลา

น้ำหมักจากถังเก็บซึ่งมีขนาด 50 ลิตร จะถูกส่งขึ้นไป  
ตามท่อไปยังด้านบนของคอสมันต์ชั้นที่หนึ่ง เข้าสู่หัวกระจายน้ำหมัก โดยมีประตุน้ำเป็น  
เครื่องช่วยควบคุมอัตราการไหลของน้ำหมัก เมื่อน้ำหมักตกลงสู่ด้านล่างคอสมันต์น้ำหมักนี้  
จะไหลออกทางระบบท่อกาสก์น้ำ หรือระบบท่อน้ำล้น

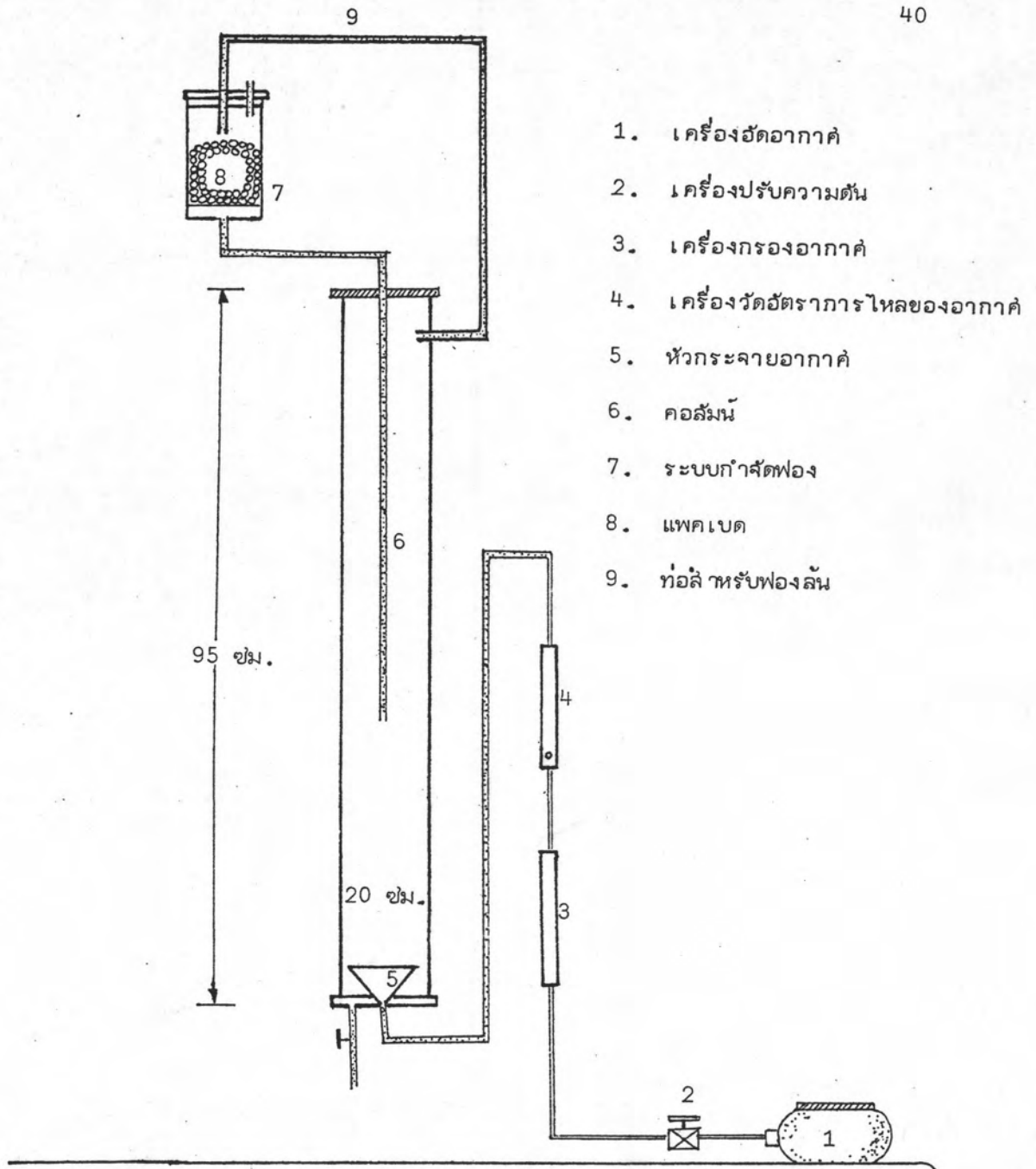
เข้าสู่หัวกระจายน้ำหมักของคอสมันต์ชั้นที่สอง ในทำนองเดียวกันน้ำหมักจะไหล  
ออกทางคอสมันต์ชั้นที่สองด้วยระบบท่อกาสก์น้ำหรือระบบท่อน้ำล้น เข้าสู่หัวกระจายน้ำหมัก  
ของคอสมันต์ชั้นที่สาม และออกจากคอสมันต์ชั้นที่สามเข้าสู่คอสมันต์ชั้นที่สี่ตามลำดับ และออกจาก  
คอสมันต์ชั้นที่สี่ลงสู่ถังเก็บอย่างเต็ม

ข. เครื่องหมักอนุกรมสองชั้นแบบแยกคอสมันต์ ดังรูปที่

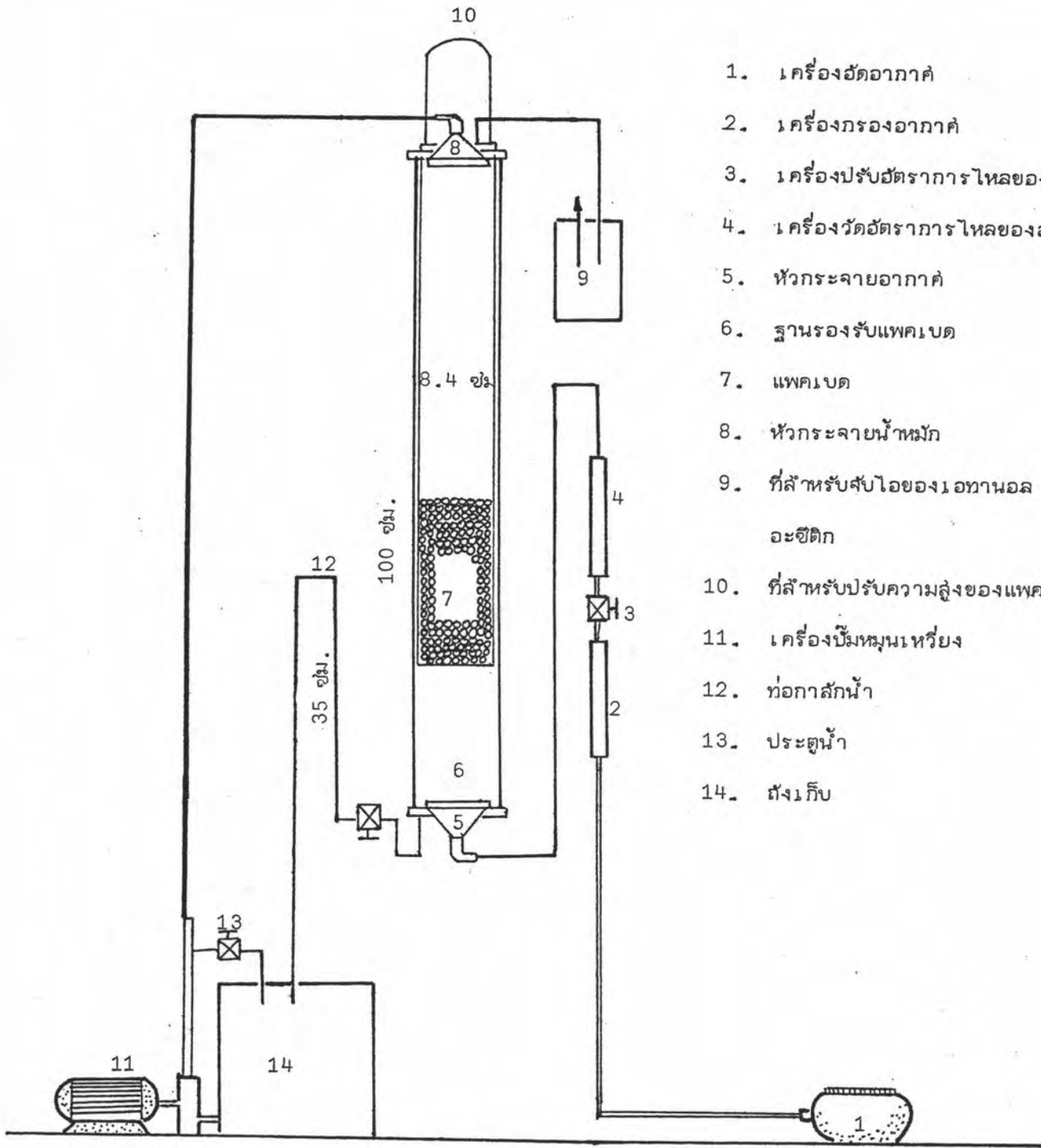
12 โดยนำเอาคอสมันต์จากเครื่องหมักสี่ชั้นแบบแยกคอสมันต์ (3.1.2.2 ก.) สองชั้น  
มาต่อกันเป็นหนึ่งชั้น ดังนั้นคอสมันต์ของเครื่องหมักแบบนี้จึงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน  
7.2 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ภายในบรรจุแพคเกจลักษณะทรงกลมขนาดเส้น  
ผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร จำนวน 180 ลูก มีลักษณะการทำงานเช่นเดียวกับเครื่องหมัก  
สี่ชั้นแบบแยกคอสมันต์

ค. เครื่องหมักอนุกรมสี่ชั้นแบบรวมคอสมันต์ ดังรูปที่

13 โดยนำเอาคอสมันต์จากเครื่องหมักสี่ชั้นแบบแยกคอสมันต์ สี่ชั้นมาต่อกันเป็นหนึ่งชั้น  
ดังนั้นคอสมันต์ของเครื่องหมักแบบนี้จึงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7.2 เซนติเมตร สูง  
100 เซนติเมตร ภายในบรรจุแพคเกจลักษณะรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5  
เซนติเมตร จำนวน 360 ลูก โดยบรรจุในแต่ละชั้นของคอสมันต์ชั้นละ 90 ลูก

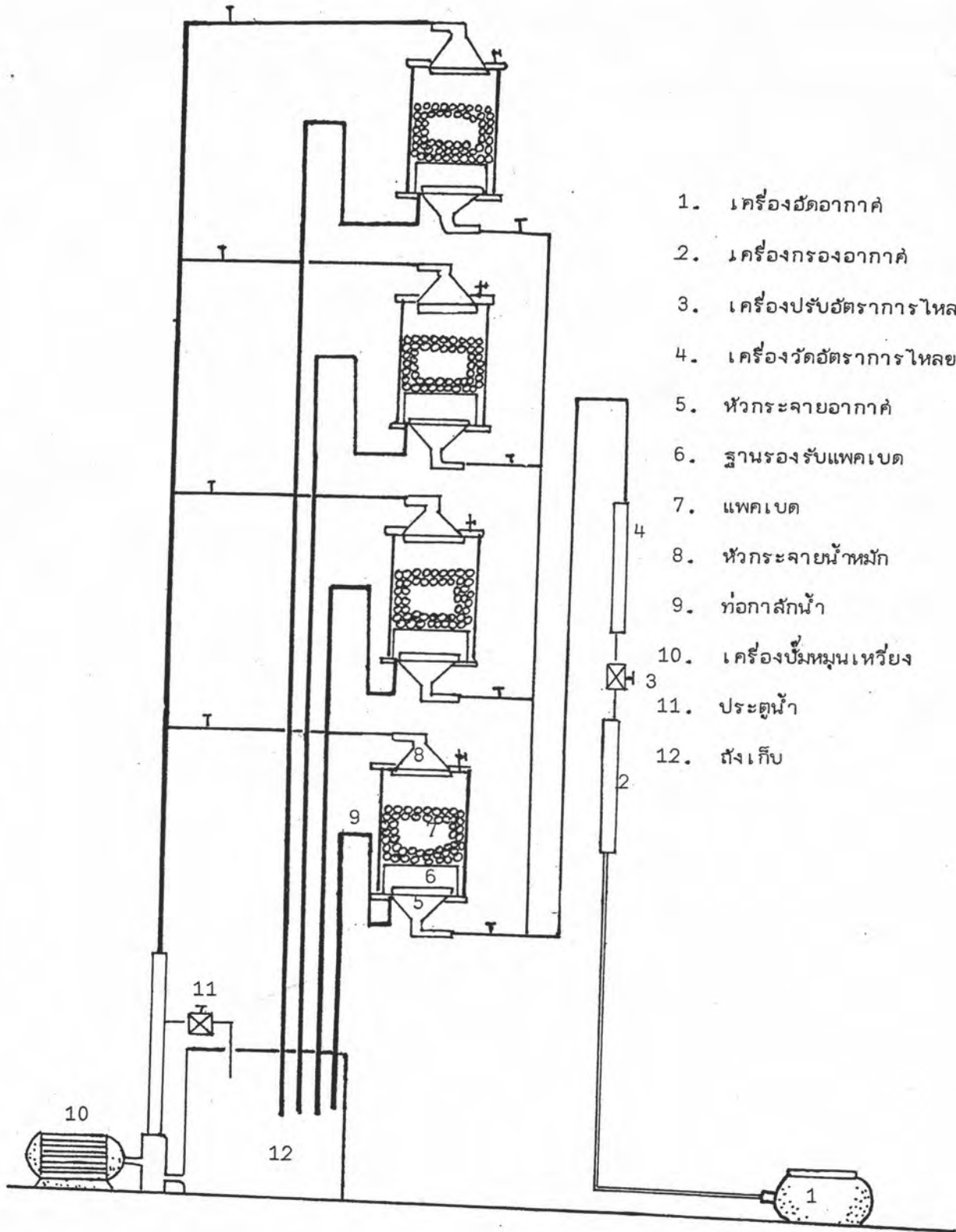


รูปที่ 7 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักเอทานอล



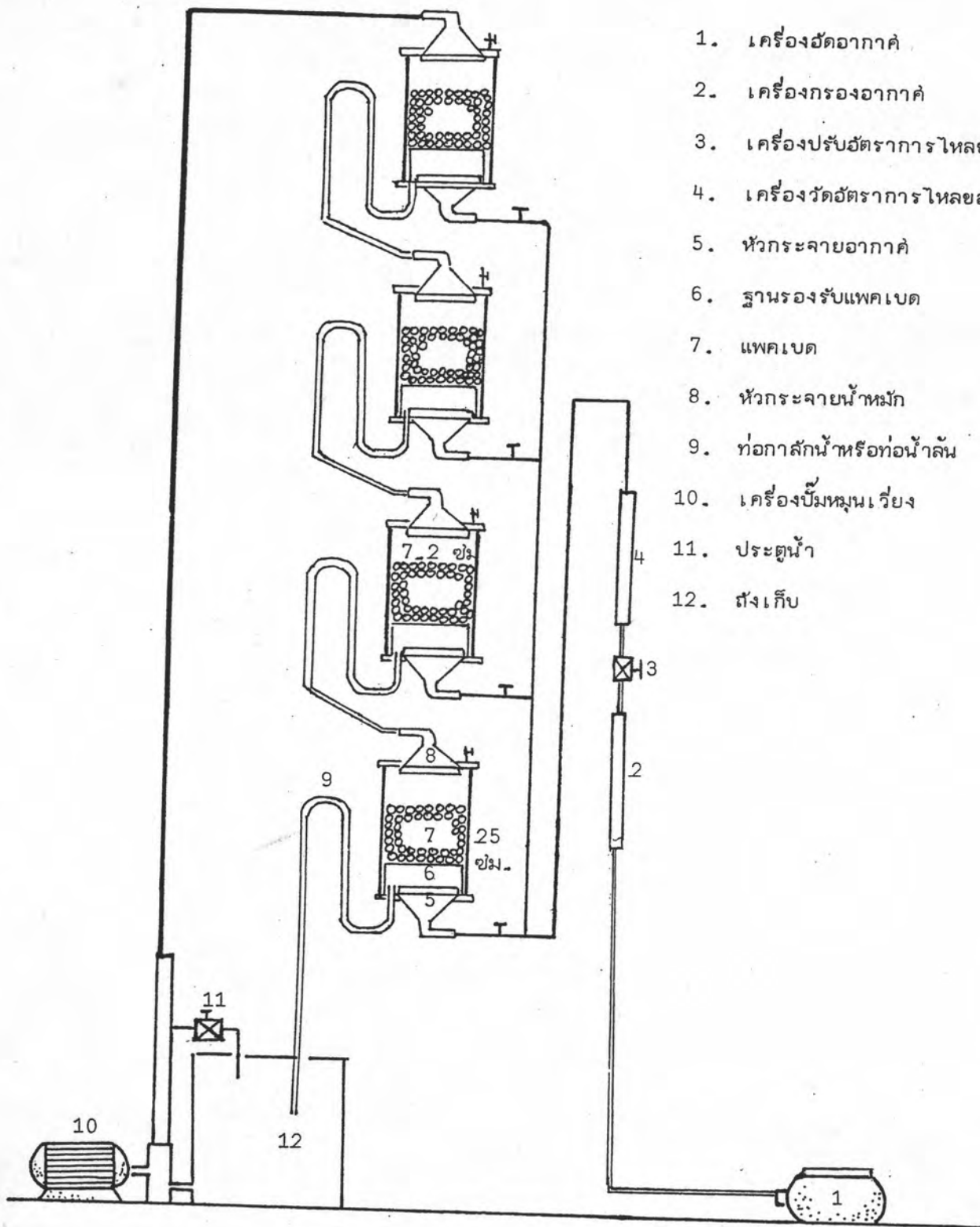
1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องปรับอัตราการไหลของอากาศ
4. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
5. หัวกระจายอากาศ
6. ฐานรองรับแพคเบด
7. แพคเบด
8. หัวกระจายน้ำหมัก
9. ที่สำหรับสับโอของไอของเอทานอล และกรดอะซิติก
10. ที่สำหรับปรับความสูงของแพคเบด
11. เครื่องบีบหมุนเหวี่ยง
12. ท่อกาลักน้ำ
13. ประตุน้ำ
14. ถังเก็บ

รูปที่ 8 แสดงส่วนต่างๆ ของเครื่องหมักแบบแพคเบดคอสมันหนึ่งชั้น (6)



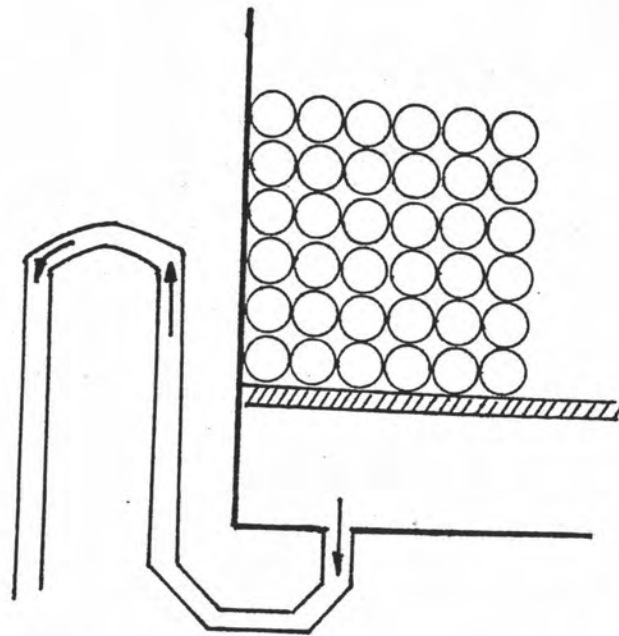
1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องปรับอัตราการไหลของอากาศ
4. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
5. หัวกระจายอากาศ
6. ฐานรองรับแพคเบต
7. แพคเบต
8. หัวกระจายน้ำหมัก
9. ท่อกาสกิน้ำ
10. เครื่องเป่าหมุนเหวี่ยง
11. ประตูน้ำ
12. ฝงเก็บ

รูปที่ 9 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักสาคอสมันแบบขนาน

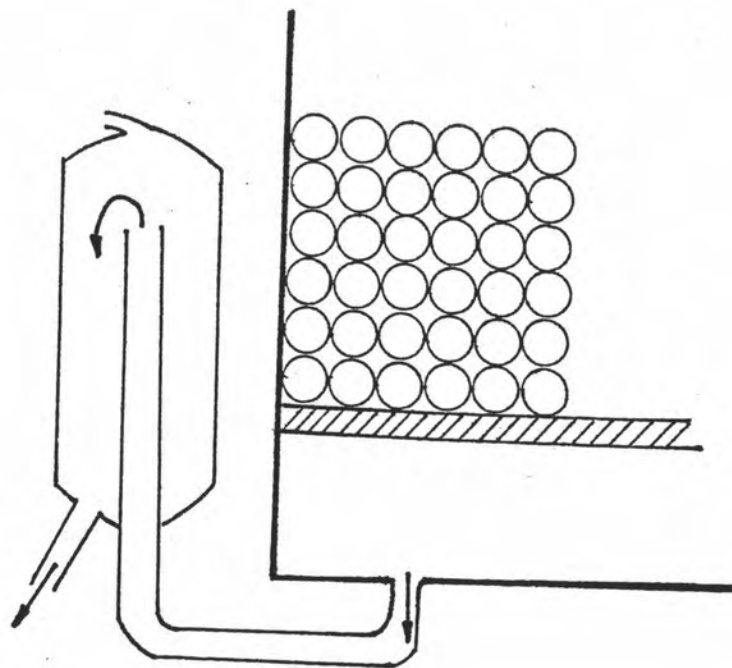


1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องปรับอัตราการไหลของอากาศ
4. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
5. หัวกระจายอากาศ
6. ฐานรองรับแพคเบต
7. แพคเบต
8. หัวกระจายน้ำหมัก
9. ท่อกาลักน้ำหรือท่อน้ำล้น
10. เครื่องบีบหมุนเวียน
11. ประตุน้ำ
12. ถังเก็บ

รูปที่ 10 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักอนุกรมสี่ชั้นแบบแยกคอสัมน์



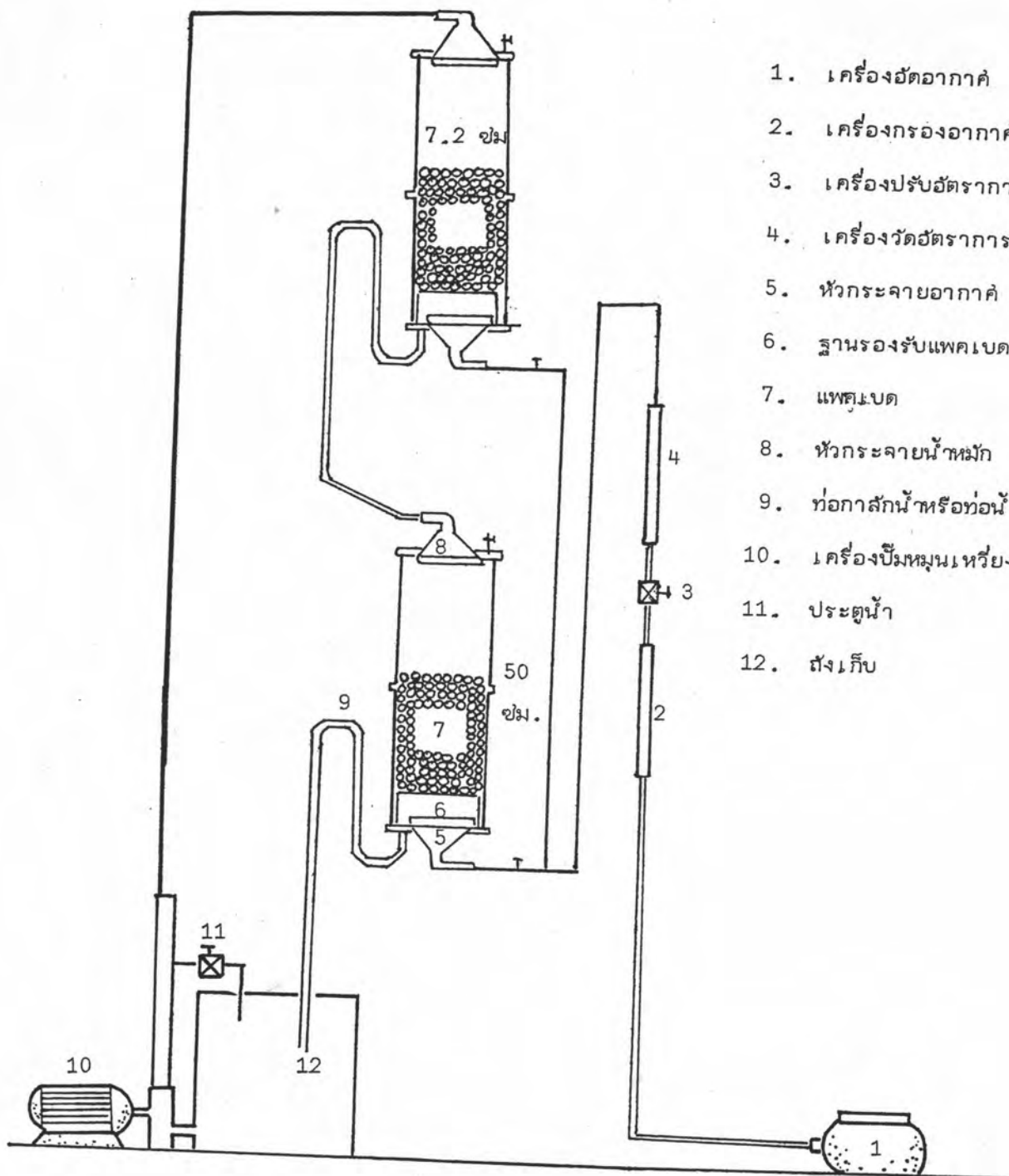
ก. ระบบกาสักน้ำ



ข. ระบบท่อน้ำล้น

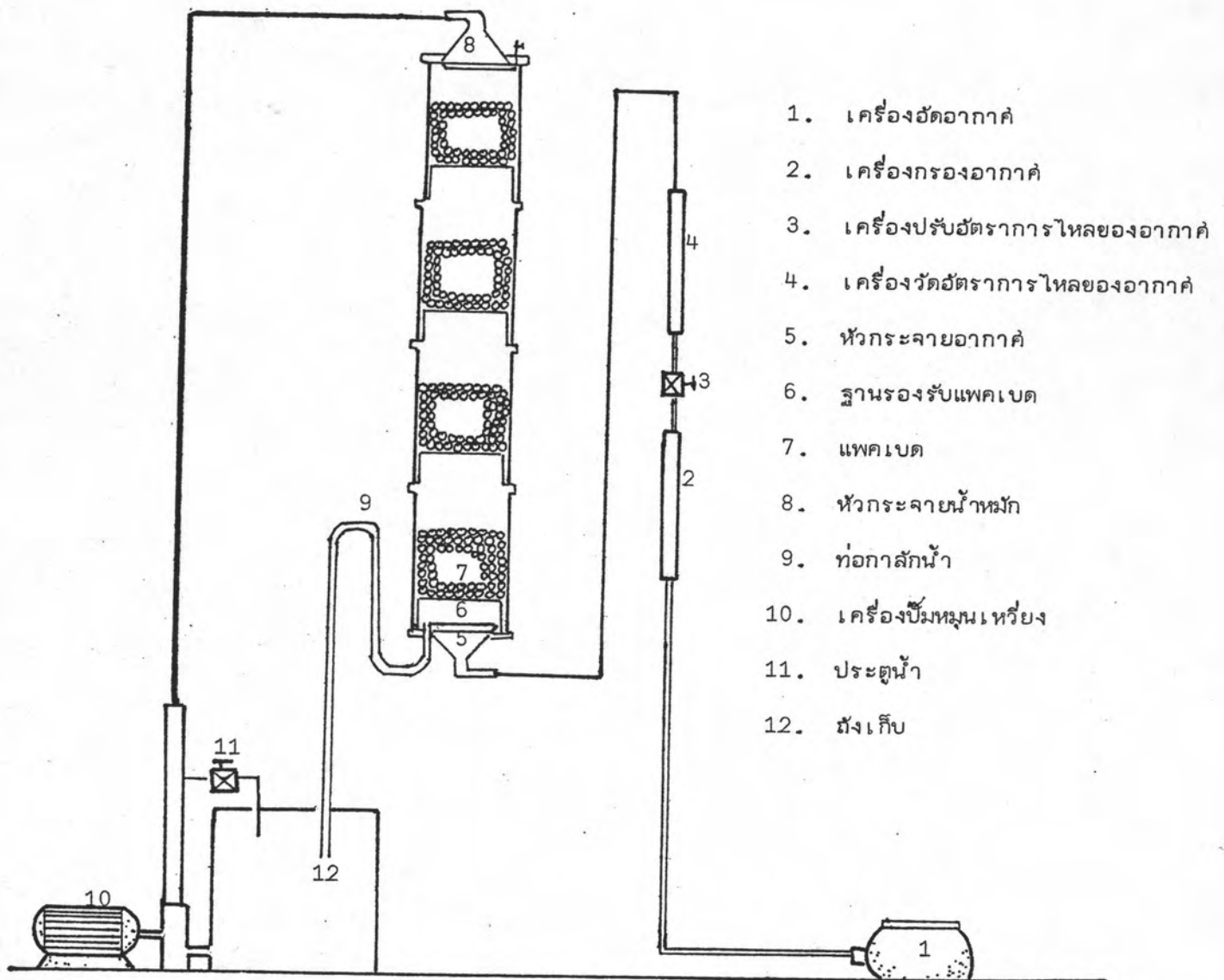
รูปที่ 11 แสดงระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก





1. เครื่องอัดอากาศ
2. เครื่องกรองอากาศ
3. เครื่องปรับอัตราการไหลของอากาศ
4. เครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ
5. หัวกระจายอากาศ
6. ฐานรองรับแพคเบด
7. แพคเบด
8. หัวกระจายน้ำหมัก
9. ท่ออากาศน้ำหรือท่อน้ำล้น
10. เครื่องบีบหมุนเหวี่ยง
11. ประตูน้ำ
12. ถังเก็บ

รูปที่ 12 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักอนุกรมสองชั้นแบบแยกคอสัมพันธ์



รูปที่ 13 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องหมักอนุกรมสี่ชั้นแบบรวมคอสมัน

## 3.2 วิธีการ



### 3.2.1 วิธีการทดลอง

แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ

3.2.1.1 การเตรียมวัสดุตัวกลางที่ยึดเกาะของเชื้อ (packing material) วัสดุตัวกลางที่ยึดเกาะของเชื้อ มีลักษณะรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ประกอบด้วย ไม้มะค่า (*Azelia xylocarpa Craib*) ไม้ตะเคียน (*Hopea odorata Toxb*) ไม้สัก (*Tectona grandis Linn*) ไม้ไผ่ (*Bambusa spp.*) ไม้แดง (*Xylia xylocarpa Taub*) พลาสติก น้ำพวกวัสดุที่ยึดเกาะของเชื้อ เหล่านี้ ยกเว้นพลาสติก แยกกระดาษรองรอยละ 5 เพื่อกำจัดกลิ่นและสี ล้างกรดออกด้วยน้ำ ต้มจนน้ำเดือดโดยเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้งจนน้ำที่ต้มใส แล้วนำไป เสิร์ฟโรซที่ 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

3.2.1.2 การเตรียมไวน์สับปะรด ใช้น้ำสับปะรดที่มีความเข้มข้น 18 องศาบริกซ์ นำไปหมักในเครื่องหมักตั้งรูปที่ 7 โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. ellipsoideus* แล้วใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.05 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.01 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 เป็นสารอาหารเสริม หมักจนได้ไวน์สับปะรดซึ่งมี เอทานอลร้อยละ 11 โดยปริมาตร หลังจากนั้นนำมาฆ่าเชื้อที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

### 3.2.1.3 การเตรียมน้ำส้มสายชู

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

- ก. การเตรียมน้ำหมัก เริ่มต้น
- ข. การเตรียมน้ำหมัก เริ่มต้น

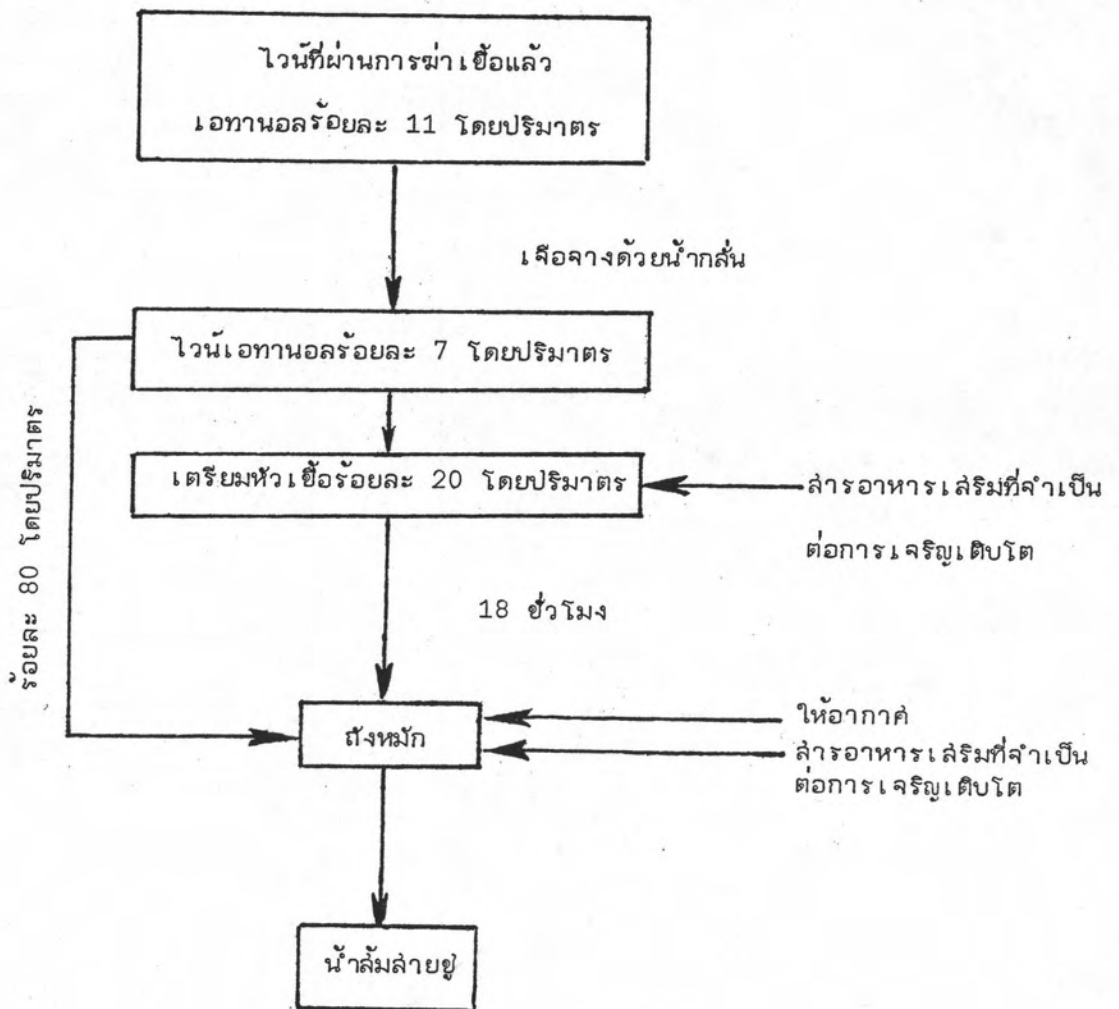
ก. การเตรียมน้ำหมักเริ่มต้น ใช้ไวน์สับปะรดที่ได้มา  
เลือกลงให้ได้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 7 โดยปริมาตร เติมกรดอะซิติกเพื่อปรับปริมาณกรด  
ในน้ำหมักให้ได้ปริมาณกรดร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ข. การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น เชื้อเชื้อ A. aceti  
ลงสู่สารอาหารเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประกอบด้วย ยีสต์แอกแทรกท์ เปปโตน แมนนิทอล  
และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.05, 0.03, 0.05 และ 0.3 ตามลำดับ  
ลงในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ 240 รอบต่อนาทีเป็น  
เวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Richardson K.C. ( 15 ) แล้วนำส่วนนี้ไปผสมกับ  
ไวน์ใส่ลงในคอสมันน์ ที่บรรจุแพคเกจเพื่อเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น ให้ได้ร้อยละ 20 โดย  
ปริมาตรของหมักทั้งหมด และให้อากาศเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเติมส่วนที่เหลือ  
อีกร้อยละ 80 ลงใน และปล่อยให้เชื้อหมักเริ่มต้นที่เตรียมได้ในคอสมันน์ลงสู่ถัง เปิดปั๊ม  
หมุนเหวี่ยงพร้อมทั้งปรับอัตราการไหลเข้าของน้ำหมักและอากาศให้ได้ตามต้องการ

### 3.2.2 วิธีวิเคราะห์

ในระบบการหมักนี้ได้ทำการวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณเอทานอลโดยวิธีของ A.O.A.C. (22)
- ปริมาณกรดอะซิติกโดยวิธีของ A.O.A.C. (22)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid)  
โดยใช้แอนดรีเฟร คโตมิเตอร์ (hand refractometer)
- ความหนาแน่นของน้ำหมัก โดยใช้วัดหาความถ่วงจำเพาะ
- ความเป็นกรด ต่าง (pH) โดยใช้ pH-meter Electronic  
Instruments Limited, Serial No. 7010/582
- ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer  
UV.M. JEAN et. R. Constant No. 5347 ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
- จุลหภูมิ ใช้เทอร์โมมิเตอร์



รูปที่ 14 ขั้นตอนในการผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์สับปะรด

### 3.2.3 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.3.1 ศึกษาถึงวัสดุต่าง ๆ ที่ใช้เป็นแบบแพคเบต วัสดุที่ศึกษาคือ ไม้มะค่า ไม้สัก ไม้ตะเคียน ไม้แดง ไม้ไผ่ และพลาสติก เพื่อหาวัสดุที่เหมาะสมในการนำพาใช้ในการผลิตกรดอะซิติกโดยแบ่งเป็น 2 แบบ

ก. ศึกษาในขวดเขย่าที่ 240 รอบต่อนาที โดยใช้แพคเบตซึ่งผ่านกรรมวิธีการทำความสะอาดตามหัวข้อ 3.2.1.1 แล้วจุ่มกรดอะซิติกและทิ้งให้เสด็จน้ำ บรรจุในขวดจำนวน 70 ลูก ใช้เอทานอลร้อยละ 6 โดยปริมาตร 100 มิลลิลิตร เชื้อ *A. aceti* และยีสต์แอกแทรกท์ เปปโติน แมนนิทอล ไตแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ร้อยละ 0.05, 0.03, 0.05 และ 0.3 เป็นสารอาหารเสริมตามลำดับ

ข. ศึกษาในเครื่องหมักแบบหนึ่งชั้น ตามหัวข้อ (3.1.2.1 ก) วิธีการทดลองตามหัวข้อ 3.2.1.3

3.2.3.2 ศึกษาถึงอัตราส่วนของเอทานอลและกรดอะซิติก เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักกรดอะซิติก โดยศึกษาในเครื่องหมักแบบหนึ่งชั้น ที่อัตราส่วนร้อยละของเอทานอล (ปริมาตร/ปริมาตร) ต่อร้อยละของกรดอะซิติก (น้ำหนัก/ปริมาตร) 7:1, 8:1, 7:2, 6:2

3.2.3.3 การศึกษาในเครื่องหมักอนุกรมสี่ชั้นแบบแยกคอสมันน์ ตามหัวข้อ (3.1.2.2 ก) เพื่อหาลำภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักกรดอะซิติก ดังนี้

ก. ระบบการไหลของน้ำหมักคือ ระบบกาสักน้ำ ระบบท่อน้ำล้น

ข. อิทธิพลของอัตราส่วนของปริมาตรแพคเบตต่อปริมาตรช่องว่างเหนือแพคเบตดังนี้ 1:1.85, 1:0.95

3.2.3.4 การศึกษาในเครื่องหมักแบบอนุกรมสองขั้นแบบแยกคอสมันน์ ตามหัวข้อ (3.1.2.2 ข) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักกรดอะซิติก ดังนี้

ก. อัตราการให้อากาศ 0.00, 0.02, 0.04 และ 0.21 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อ นาที

ข. ระบบการไหลออกของน้ำหมักคือ ระบบภาสก์น้ำ ระบบท่อน้ำล้น

ค. การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นคือ เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในคอสมันน์ทั้งหมดและเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นในคอสมันน์ร้อยละ 50

3.2.3.5 การศึกษาในเครื่องหมักสี่คอสมันน์แบบขนาน ตามหัวข้อ (3.1.2.1 ข) เพื่อหาปริมาณกรดอะซิติก และการลดลงของเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ กัน

3.2.3.6 การศึกษาในเครื่องหมักอนุกรมสี่ขั้นแบบรวมคอสมันน์ ตามหัวข้อ (3.1.2.2 ค) เพื่อหาปริมาณกรดอะซิติก และการลดลงของเอทานอลที่เวลาต่าง ๆ กัน

3.2.3.7 ศึกษาการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในเครื่องหมักอนุกรมสี่ขั้นแบบรวมคอสมันน์ และทำการถ่ายน้ำหมักออกร้อยละ 50 ของ ปริมาตรทั้งหมดในชั่วโมงที่ 60 จากนั้นทำการเติมสารอาหารเสริมที่ประกอบด้วยยีสต์ แอกลแทรกท์ เปปโตน แมนนีทอล และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.05, 0.03, 0.05 และ 0.3 ตามลำดับ พร้อมกับเติมไวน์ลงไปเท่ากับจำนวนที่ดึงออกมา โดย กำหนดให้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 6