หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตเอทธานอลในประเทศไทย วัตถุดิบที่ใช้คือ กากน้ำตาลประเภท Blackstrap (การผลิตเอทธิแอลกอฮอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง 2520, สุกัญญาและอุบล, 2514) และมันสำปะหลัง (การผลิตเอทธิลแอลกอฮอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง, 2520) ยังไม่มีข้อมูลละเอียดพอเกี่ยวกับการผลิตเอทธานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ ประกอบกับขณะเริ่มคิดโครงการวิจัยนี้ น้ำตาลมีราคาตกต่ำ และอ้อยล้นตลาดจึงมีจุดประสงค์จะแปรรูปจากน้ำอ้อยเป็นเอทธานอล เพื่อประโยชน์ 2 ประการคือ แก้ปัญหาอ้อยล้นตลาดและได้ประโยชน์ทางด้านพลังงานทดแทนด้วย ส่วนจุลินทรีย์ใช้สายพันธุ์คัดของยีสต์จากผลตาลสุกเปรียบเทียบยีสต์สายพันธุ์คัดจากแหล่งอื่น ทั้งนี้เพื่อศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการหมักเอทธานอลจากน้ำอ้อย โดยวิธีดำเนินการเป็นขั้นตอนดังนี้

1. <u>การเก็บรักษาน้ำตาลในน้ำอ้อย</u>

เนื่องจากน้ำอ้อยที่นำมาใช้เป็นน้ำอ้อยสด ปริมาณของน้ำตาลถูกทำลายด้วยจุลินทรีย์ จึงต้องใช้วิธีรักษาให้มีปริมาณน้ำตาลสูญเสียไปน้อยที่สุด และสามารถเก็บได้นาน จึงใช้สารกันเสีย (preservative) 2 ชนิด คือ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) และโซเดียมเบนโซเอท (sodium benzoate) โดยเตรียมสารละลายดังนี้

โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ให้มีความเข้มข้น 0.02 0.1 0.3 0.5 และ 0.7 กรัม/ลิตร

โซเดียมเบนโซเอท ให้มีความเข้มข้น 0.3 0.5 0.7. 1.0 และ 2.0 กรัม/ลิตร

วิธีการตวงน้ำอ้อย 100 มล. ใส่ฟลาสที่อบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 250 มล. ใช้ไปเปตที่ปราศจากเชื้อ ดูดสารกันเสียที่ละลายไว้แล้วทุก ๆ ความเข้มข้น ปริมาณ 1 มล. ใส่ในฟลาสที่มีน้ำอ้อย ปิดจุกฟลาสเก็บน้ำอ้อยไว้เป็นเวลาต่างกัน คือ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 1 2 3 5 7 วัน แล้วไปใช้ไปเปตขนาด 1 มล. ดูดน้ำอ้อยจากแต่ละฟลาสมา 0.2 มล. ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (สูตรอาหารที่ 4 ในภาคผนวก หน้า 93) สำหรับทดสอบจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยที่ใส่สารกันเสีย ใช้แท่งแก้วงอ (sterile bent glass rod) กระจายหยดน้ำผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เชื้อที่มีอยู่ขึ้นกระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผล

ในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำอ้อยใช้หลักการเดียวกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำองุ่นเพื่อแยกหายีสต์ที่มีประโยชน์ในการหมักเหล้าองุ่น ตามหลักการของ Beech และ Carr (1960)

2. <u>การเก็บเชื้อและการแยกเชื้อ</u> (collection and isolation)

เก็บตัวอย่างผลตาลสุกจากตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพฯ 6 แห่งและจากจังหวัดใกล้เคียง 4 จังหวัด คือ จังหวัดนนทบุรี สระบุรี ปทุมธานี และนครปฐม รวม 10 แห่ง โดยเลือกผลตาลที่สุกงอมเต็มที่ มีรอยแตก ใส่ถุงพลาสติก นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ปรับความเป็นกรดในระดับ pH 4.5 เอาน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มล. ใส่หลอดทดลอง ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อโดยฆ่าเชื้อในตู้อบ 160°ซ. เวลา 2 ชั่วโมง หรือในเอทธานอล 70% ลนฆ่าเชื้อด้วยเปลวไฟโดยตรง ดึงเนื้อลูกตาลเส้นเหลือง ๆ ใต้ผิวลงในหลอดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้หรือใช้ปลายมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเอาน้ำใต้ผิวลูกตาลรอยเดิมผสมลงในหลอดน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน ใช้ไปเปตดูดสารละลายของน้ำลูกตาล 0.2 มล. หยดลงบนผิวหน้าของจานอาหารแข็ง YM ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วจานอาหาร เก็บจานเลี้ยงเชื้อนี้บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 – 2 วัน เมื่อเชื้อยีสต์ขึ้นส่องดูดด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิดสองตา ศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนี เลือก

กลุ่มเชื้อที่ขึ้นเดี่ยว ๆ และที่มีจำนวนมาก ๆ เอามาแยกเชื้อโดยการ streak plate ซ้ำจนได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ (ปราโมทย์, 2521; Faparusi, 1973; Okafor, 1972) เก็บเชื้อยีสต์ไว้ใน slant YM ซึ่งมี pH 6 เชื้อยีสต์สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์และเก็บเชื้อใน YM slant ซึ่งได้จากแหล่งอื่นอีก 4 สายพันธุ์ คือ S_{90} จากโรงงานสุรา 1 S_{10} จากโรงงานสุรา 2 C_1 ยีสต์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และยีสต์ที่ได้จากการแยกจากน้ำอ้อยหลายตัวอย่างแต่เลือกมาจากตัวอย่างที่มียีสต์ขึ้นเป็นสายพันธุ์ที่ขึ้นเป็นจำนวนมาก มาใช้และให้ระหัสชื่อเชื้อเป็น C_2

อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ต่อไปจะเรียกเป็นอาหารสูตร 1 มีรายละเอียดส่วนผสมของสารต่าง ๆ ในสูตร 1 (ในบทภาคผนวกหน้า91)

3. <u>การจำแนกชนิดของเชื้อ</u> (indentification)

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลตาลสุกในข้อ 2 มาจำแนกชนิดโดยดำเนินตามวิธีการของ Lodder (1974) ศึกษาลักษณะ รูปร่าง และสีของโคโลนีที่เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง YM (สูตร 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตลักษณะโคโลนี และนำยีสต์ที่คัดได้เลี้ยงในอาหารเหลว YM (สูตร 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำมาทำ fresh smear ส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 40 x 10 วัดขนาดของเซลล์โดยใช้ micrometer หาค่าเฉลี่ยของเซลล์จากตัวอย่างไม่น้อยกว่า 20 เซลล์ ศึกษาลักษณะการเจริญ การสืบพันธุ์ของเชื้อ ความสามารถในการหมักน้ำตาล ในการใช้น้ำตาลและความสามารถในการใช้เกลือไนเตรต

4. <u>การคัดเชื้อ</u> (screening)

การศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้เอทธานอลจากการหมักน้ำอ้อยในสภาพที่เหมาะสม

นำเชื้อยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้จากลูกตาลที่ได้จากตลาดสดในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียงรวม 20 สายพันธุ์ โดยใช้ชื่อดังนี้ คือ A_1 A_2 A_3 A_4 A_5 A_6

A_7 A_8 A_9 A_{10} B_1 B_2 B_3 B_4 B_5 B_6 B_7 B_8 B_9 B_{10} กับเชื้อยีสต์ที่ได้จากแหล่งอื่นอีก 4 สายพันธุ์ คือ S_{90} S_{10} C_1 และ C_2

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้ซูโครสเป็น C-source ใช้สูตรอาหารเหลว 2 ชนิด คือ

4.1.1 ใช้น้ำตาลซูโครสและเพิ่มอาหารเสริม

นำเชื้อทั้งหมด 24 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพของการหมักเพื่อให้เกิดเอทธานอลโดยนำเชื้อเก็บ (stock culture) อายุ 1 วัน ใส่ในฟลาสซึ่งในการคัดเลือกขั้นต้นนี้ใช้ซูโครสเป็น C-source คือใช้น้ำตาลซูโครส 20 กรัม% (17 – 18 °บริกซ์) กับน้ำตาลซูโครส 25 กรัม% (20 – 21 °บริกซ์) เติมอาหารเสริมต่าง ๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โปตัสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม ยีสต์เอกซ์แทรก 0.4 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับระดับความเป็นกรดด่างด้วยกรด HCl 1N NaOH 1N ให้ได้ระดับ pH 4.5 ซึ่งต่อไปจะเรียกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็น C-source นี้ว่าสูตร 2 (ในบทภาคผนวก) ซึ่งสูตรนี้ได้ดัดแปลงจากผลงานวิจัยที่ทดลองเกี่ยวกับยีสต์และเอทธานอลดังนี้ Rose (1976) ใช้น้ำตาลซูโครส 20 และ 25 กรัม% ปริมาณอาหารเสริมต่าง ๆ อุณหภูมิและ pH รวบรวมและดัดแปลงจากผลงานของเครือวัลย์ (2520) Ahmad และคณะ (1954) Bach และคณะ (1978) Concone และคณะ (1976) และข้อมูลจากโรงงานสุราอยุธยา

วิธีการทำดัดแปลงภาวะต่าง ๆ เพียงเล็กน้อยจากการทดลองของเครือวัลย์ (2520) ใช้เชื้อเก็บอายุ 1 วัน ใส่เชื้อยีสต์ลงในฟลาสขนาด 150 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว YM 50 มล. ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อปรับตัวเมื่อเปลี่ยนสภาพอาหารจากอาหารแข็งมาเป็นอาหารเหลว แล้วนำมาวางบนเครื่องเขย่า ของ Lab-Line Junior Orbit Shaker หมุนด้วยความเร็ว 150 rpm. ที่อุณหภูมิ 26 °ซ. เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดจำนวนเซลล์โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectronic 20 (Bausch & Lomb) ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนมิเตอร์ (nm)

ปรับความขุ่นของ suspension ให้ได้ OD ประมาณ 0.5 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 2×10^7 เซลล์ นำมา 20 มล. ใส่ในฟลาสขนาด 500 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็น C-source (สูตร 2 ในภาคผนวกหน้า 92) จำนวน 180 มล.

วัดปริมาณน้ำตาลเมื่อเริ่มต้นการหมักด้วยเครื่อง Hand Refractometer ซึ่งจะอ่านค่าน้ำตาลเป็นองศาบริกซ์ (°บริกซ์) ค่าองศาบริกซ์เปลี่ยนเป็นกรัมของน้ำตาลซูโครสต่อ 100 มล. ของสารละลายน้ำตาล สารละลายซูโครส 20 กรัม% อ่านค่าองศาบริกซ์ได้ 17 – 18 °บริกซ์, ซูโครส 25 กรัม% อ่านค่าองศาบริกซ์ได้ 20 – 21 °บริกซ์ ในการวัดน้ำอ้อยพบว่าจะมีค่าองศาบริกซ์ 18 – 21 °บริกซ์ ซึ่งถ้า 19.2 °บริกซ์ มีค่าน้ำตาลรีดิวซิ่งทั้งหมดเท่ากับ 22.8 กรัม/100 มล. หรือกรัม% ตามวิธีการวิเคราะห์ปริมาณรีดิวซิ่งชูการ์ในภาคผนวก และโมลาส (กากน้ำตาล) มีค่าน้ำตาลรีดิวซิ่ง 54% (สุกัญญา และอุบล, 2514) เมื่อวัดปริมาณน้ำตาล เริ่มต้นการหมักโดยวางฟลาสบนเครื่องเขย่า หมุนด้วยความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิ 26 °ซ. วัดปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง Hand Refractometer และวัดปริมาณเอทธานอลด้วยเครื่องวัดแอลกอฮอล Ebulliometer เมื่อสิ้นสุดการหมักในเวลา 7 วัน

การวัดปริมาณแอลกอฮอลด้วยเครื่องอีบูลลิโอมิเตอร์ก็โดยการหาจุดเดือดของน้ำกลั่นก่อนแล้วหมุนแผ่นเทียบเปอร์เซนต์แอลกอฮอลที่ 0% ให้ตรงกับอุณหภูมิของจุดเดือดของน้ำกลั่น เมื่อได้ค่าจุดเดือดของสารละลายแต่ละตัวอย่างที่ต้องการทราบเปอร์เซนต์แอลกอฮอลแล้วก็อ่านค่าจากตารางแผ่นเทียบว่า จุดเดือดของสารละลายที่ต้องการวัดเปอร์เซนต์แอลกอฮอลตรงกับเปอร์เซนต์แอลกอฮอลที่เท่าไร ก็ทราบค่าเปอร์เซนต์ของแอลกอฮอลในสารละลายตัวอย่างนั้น ๆ เช่น

จุดเดือดวัดเป็น °ซ.	เทียบเปอร์เซนต์แอลกอฮอลของสารละลาย
99.98	0
95.4	5.12
93.5	8.02
92.1	10.4

สำหรับรายละเอียดหลักการใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล Ebulliometer ดูในภาคผนวก หน้า 97

4.1.2 ใช้น้ำอ้อยและเพิ่มอาหารเสริม

เมื่อได้สายพันธุ์ยีสต์ที่ให้ปริมาณเอทธานอลสูงจากข้อ 4.1.1 จำนวน 10 สายพันธุ์ คือ A_1 A_2 A_3 A_4 A_5 A_6 A_7 A_8 A_9 A_{10} นำมาคัดอีกรอบหนึ่งโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ S_{90} เปรียบเทียบตลอดเวลา และเปลี่ยนจากใช้น้ำตาลซูโครส เป็น C-source มาใช้น้ำอ้อย ซึ่งส่วนใหญ่มีซูโครสเป็น C-source ถึง 70 – 80% (Spencer-Meade, 1963) สำหรับรายละเอียดสารประกอบต่าง ๆ ในน้ำอ้อยดูในภาคผนวก หน้า 110

ในน้ำอ้อยซึ่งส่วนใหญ่มีซูโครสและเติมปริมาณอาหารเสริมต่าง ๆ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม ยีสต์เอกซ์แทรก 0.4 กรัมในน้ำอ้อย 1 ลิตร ปรับระดับความเป็นกรดที่ pH 4.5 ซึ่งต่อไปจะเรียกอาหารที่ใช้ในการหมักนี้ว่า สูตร 3

วิธีการเตรียมทำ inoculum นำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกที่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็น C-source แล้วให้ปริมาณเอทธานอลสูงกับสายพันธุ์ S_{90} มาเตรียม inoculum อายุ 1 วัน สำหรับการทดลองที่ใช้น้ำอ้อยโดยการถ่ายเชื้อยีสต์ลงในฟลาสขนาด 150 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว YM 50 มล. ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง นำมาเขย่า 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำมา 20 มล. ใส่ในฟลาสขนาด 500 มล. ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อยเป็น C-source (สูตร 3 ในภาคผนวกหน้า 92 จำนวน 180 มล. วัดปริมาณน้ำตาลเมื่อเริ่มต้นการหมักด้วยเครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ วางฟลาสบนเครื่องเขย่า หมุนด้วยความเร็ว 80 rpm (สุกัญญาและอุบน, 2514) อุณหภูมิ 28 °ซ. วัดปริมาณน้ำตาลด้วยรีแฟรคโตมิเตอร์และวัดปริมาณเอทธานอลด้วยเครื่องEbulliometer เมื่อสิ้นสุดการหมักในวันที่ 4 และวันที่ 7 เพื่อจะคัดเชื้อยีสต์ที่สามารถสร้างเอทธานอลได้ปริมาณสูงจากอาหารสูตรน้ำอ้อย

4.2 การคัดสายพันธุ์ยีสโดยใช้อุณหภูมิ

สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 4.1.2 ที่สร้างเอทธานอลสูง จำนวน 5 สายพันธุ์ และ S_{90} เพื่อใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ มาคัดสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักน้ำอ้อยให้ได้เอทธานอลสูงในที่อุณหภูมิ 40 °ซ. โดยการใช้ inoculum อายุ 1 วัน จำนวน 10% ของอาหารหมักที่มีน้ำอ้อยเป็น C-source (อาหารสูตร 3 ในภาคผนวกหน้า 92) ในการทดลองนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

4.2.1 นำฟลาสที่มีอาหาร 180 มล. และ inoculum 10% (20 มล.) แล้วไปหมุนด้วยความเร็ว 80 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วปรับอุณหภูมิเป็น 40 °ซ. วัดปริมาณเอทธานอลเมื่อสิ้นสุดการหมักได้ 72 ชั่วโมง

28 °ซ. 12 ชั่วโมง — 40 °ซ. 60 ชั่วโมง — วัด% เอทธานอล

80 rpm

4.2.2 ทำในทำนองเดียวกัน แต่เริ่มหมุนที่ 80 rpm ที่อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทธานอล

40 °ซ. 72 ชั่วโมง — วัด% เอทธานอล

80 rpm

เชื้อยีสต์ที่สามารถให้เอทธานอลสูงเป็นเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือก 1 สายพันธุ์ จะใช้ในการทดลองต่อไปโดยเปรียบเทียบกับความสามารถของยีสต์สายพันธุ์ S_{90}

5. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือก

5.1 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตโดยปกติ (normal growth rate) ของยีสต์ S_{90} กับ A_4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4 โดยการหมุนที่ 150 rpm

เตรียม inoculum ของ S_{90} กับ A_4 อายุ 1 วัน ถ่ายเชื้อจำนวน 1 หลูป ลงในฟลาสขนาด 150 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว YM 50 มล. ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเชื้อยีสต์ อ่านค่า optical density (OD) ประมาณ 1.0 ดูดเชื้อยีสต์มา 20 มล. ถ่ายเชื้อลงในฟลาสขนาด 500 มล. ซึ่งมีอาหารเหลว YM 180 มล. ตั้งไว้ 1 ชั่วโมง อ่านและปรับความขุ่นของ suspension ให้ได้ OD 0.1 ด้วยอาหารเหลว YM ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปหมุนด้วยความเร็ว 150 rpm. ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. ดูดเชื้อยีสต์ใส่หลอดแก้วสำหรับวัดความขุ่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $\frac{1}{2}$" วัดความขุ่น OD ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ที่ 525 nm ทุกชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เครือวัลย์, 2520, ฉันทนา, 2522) บันทึกค่า OD ทำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

ในขณะที่ดูดเชื้อยีสต์มาวัดความขุ่นทุกชั่วโมงนั้น นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยเพื่อคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ใน 1 มล. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่น จำนวนเซลล์กับเวลาและความหนาแน่นจำนวนเซลล์กับความขุ่น (OD)

วิธีการทำเริ่มจาก subculture ของเชื้ออายุ 1 วัน ถึงช่วงเวลาของการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะใช้คำว่า "เตรียม inoculum" สรุปแทนในการกล่าวถึงในการทดลองต่อ ๆ ไป

5.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ S_{90} กับ A_4 โดยการเขย่าที่ 60 และ 80 rpm

เตรียม inoculum ของ S_{90} กับ A_4 ทำเช่นเดียวกับการหาอัตราการเจริญปกติในข้อ 5.1 เก็บเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 6 มา 20 มล. ใส่ในฟลาสขนาด 500 มล.

ซึ่งมีน้ำอ้อย (อาหารสูตร 3) 180 มล. วัดปริมาณน้ำตาลเป็นองศาบริกซ์ หมุนที่ความเร็ว 60 และ 80 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. วัดปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทธานอลทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อจะศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะในการสร้างเอทธานอลได้สูงสุด

สำหรับในกรณีที่เขย่า 80 rpm ศึกษาเปรียบเทียบเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดขึ้นเมื่อใช้น้ำอ้อย (อาหารสูตร 3) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

6. การศึกษาการเปลี่ยนสภาพอาหาร

6.1 ศึกษาสภาพความเป็นกรดที่เหมาะสม

สภาพน้ำอ้อยก่อนการทดลองซึ่งมีปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 20.2 – 20.6 °บริกซ์ pH 5.6 นำมาเติมแร่ธาตุต่าง ๆ ตามสูตร 3 ปรับสภาพให้เป็นกรดด้วย HCl 1N ให้มีระดับ pH 3.5 4 4.5 5 และ 5.5 เตรียม culture ของเชื้อยีสต์ สายพันธุ์ S_{90} และ A_4 ใช้ปริมาณเชื้อ 10% ใส่ลงในฟลาสขนาด 500 มล. ซึ่งมีอาหารสูตร 3 จำนวน 180 มล. ที่ปรับความเป็นกรดที่ระดับต่าง ๆ กันแล้ว นำไปหมุนด้วยความเร็ว 80 rpm วัดปริมาณเอทธานอลทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ฟลาสที่มีปริมาณเอทธานอลสูงสุด คือ มีสภาพความเป็นกรดที่เหมาะสม

6.2 ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลวเพื่อการหมักตามสูตร 3 โดยการเตรียมอาหารให้มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนี้คือ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ปรับสภาพความเป็นกรดโดยนำผลจากข้อ 6.1 มาใช้ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมในการหมัก โดยได้ค่าเฉลี่ยของเอทธานอลสูงสุด ใส่เชื้อยีสต์จำนวน 10% ของอาหารที่ใช้ในการหมัก หมุน 80 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลด้วยเครื่องวัดแอลกอฮอล Ebulliometer สามารถทราบค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสภาพอาหารเหลวที่จะใช้ในการหมักในข้อ 6.3

6.3 การหาปริมาณยีสต์เอกซ์แทรกที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเหลวที่มี C-source คือ น้ำอ้อยประมาณ 20.2 บริกซ์ เติมโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นผลจากข้อ 6.2 เตรียมอาหารเหลวโดยมีปริมาณยีสต์เอกซ์แทรกต่าง ๆ กันคือ 0.2 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ปรับ pH ของอาหารเหลวตามผลจากข้อ 6.1 คือ pH 4 ด้วย HCl 1N ใส่อาหารเหลวนี้ในฟลาสขนาด 500 มล. ปริมาณ 180 มล. เติมเชื้อยีสต์ 20 มล. หมุน 80 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. วัดปริมาณเอทธานอลที่ได้จากการหมักทุกฟลาสภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง ฟลาสที่มีปริมาณเอทธานอลสูงสุด คือฟลาสที่มีปริมาณยีสต์เอกซ์แทรกเหมาะสม

นำผลจากข้อ 6.1 6.2 6.3 ไปใช้ในการเตรียมอาหารน้ำอ้อยที่มีสภาพสมบูรณ์ คือมีอาหารเสริมที่ได้ปรับปริมาณให้มีสภาพเหมาะแก่การหมักเอทธานอลได้ปริมาณสูงสุดและจะเรียกเป็นสูตรอาหารที่ 5 (ในภาคผนวกหน้า 93) ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

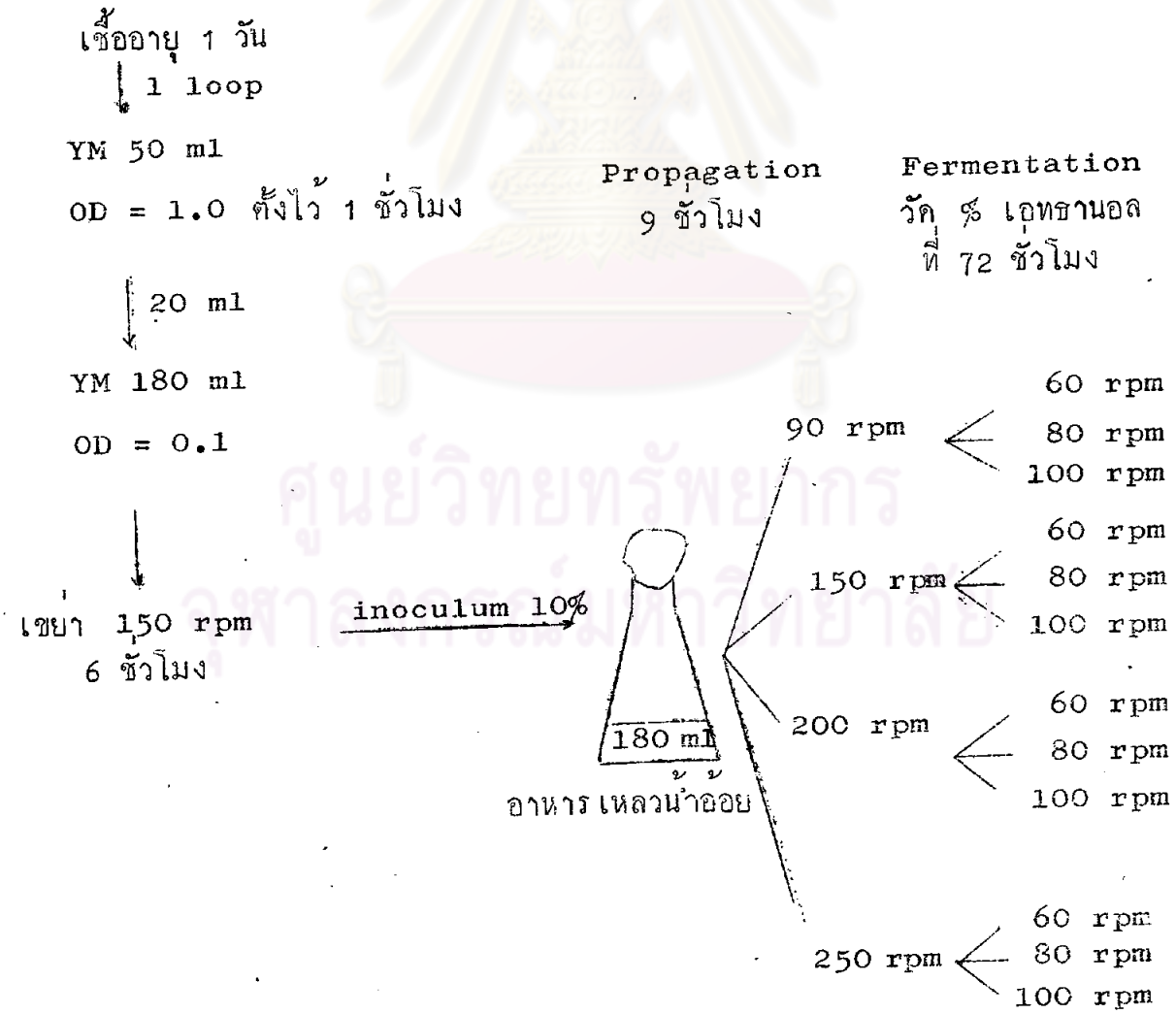
7. ศึกษาผลของอากาศต่อปริมาณเอทธานอลที่เกิดขึ้น

เตรียมอาหารตามสูตรที่ 5 ใส่ฟลาสขนาด 500 มล. จำนวนฟลาสละ 180 มล. ใส่เชื้อยีสต์ 10% (20 มล.) ปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุต่างชนิดกัน คือ ปิดจุกด้วยสำลีหุ้มฟอยล์ ปิดฟลาสด้วยฟอยล์ ปิดฟลาสด้วยสำลี และปิดฟลาสด้วยพาราฟิล์ม วัดปริมาณเอทธานอลที่เกิดขึ้นภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง โดยการปรับการหมุนที่ 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เปลี่ยนความเร็วเป็น 100 rpm

8. การหาจำนวนรอบของการหมุนต่อนาทีที่มีผลต่อการสร้างเอทธานอลในสภาพอาหารจากข้อ 6

เตรียมอาหารเหลวตามสูตร 5 ที่มีโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม ยีสต์เอกซ์แทรก 0.2 กรัม ใส่ใน

น้ำอ้อย 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย HCl 1N ให้ได้ pH 4 นำอาหารเหลวใส่ในฟลาส ขนาด 500 มล. ขวดละ 180 มล. ใส่เชื้อยีสต์ 10% แปรผันจำนวนรอบของการหมุน ต่างกัน คือ 90 150 200 และ 250 rpm. โดยให้หมุนเป็นเวลา 9 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงเวลาของการแตกหน่อให้เซลล์ใหม่ (propagation) วัดความขุ่นโดยใช้ค่า OD ที่ 525 nm คำนวณค่าประมาณจำนวนเซลล์/มล. จากผลข้อ 5.1 แล้วเปลี่ยนความเร็วของจำนวนรอบของการหมุนเป็น 60 80 และ 100 rpm ซึ่งในการหมุนช่วงหลังนี้จะเป็นช่วงของการหมัก (fermentation) เพื่อการสร้างเอทธานอล เก็บผลของทุกฟลาสหลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในการทดลองช่วงนี้เขียน diagram ได้ดังนี้



นำผลของจำนวนรอบการหมุนที่มีผลต่อการสร้างเอทธานอลได้ปริมาณสูงสุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

9. ศึกษาปริมาณและจำนวนของเชื้อยีสต์ (inoculum size)

เตรียมอาหารเหลวสภาพสมบูรณ์ (ตามสูตรที่ 5) ใส่ฟลาสขนาด 500 มล. ปริมาณอาหารเหลวที่ใส่แตกต่างกันคือ 196 190 180 และ 160 มล. ใส่เชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลวปริมาณต่างกัน คือ 6 10 20 และ 40 มล. ตามลำดับ เพื่อให้มีปริมาณและขนาดของเชื้อต่างกันเป็น 3% 5% 10% และ 20% นำฟลาสทั้งหมดหมุนด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง แล้วปรับความเร็ว 100 rpm (ตามผลจากข้อ 7) เก็บผลการวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลของทุกฟลาสภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง

10. ศึกษาความสัมพันธ์จำนวนรอบของการหมุนกับปริมาณเชื้อที่ใช้

ในอาหารเหลวของน้ำอ้อยตามสูตร 5 เติมปริมาณเชื้อต่างกัน คือ 3% 5% 10% และ 20% ซึ่งมีจำนวนเซลล์โดยประมาณ 1.8×10^8 เซลล์/มล. และ 2×10^8 เซลล์/มล. ในยีสต์สายพันธุ์ S_{90} และ A_4 ตามลำดับ นำฟลาสที่ใส่อาหารเหลวและปริมาณเชื้อต่าง ๆ กันนี้ไปหมุนด้วยความเร็วจำนวนรอบต่อนาที ต่างกันดังนี้

ช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ 9 ชั่วโมง	ช่วงเวลาของการหมัก 60 ชั่วโมง
150 rpm	100 rpm
150 rpm	0 rpm
0 rpm	0 rpm