บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการผลิตยีสต์(Candida utilis) ผลิตเอทานอล และผลิตกรดอะซีติก เป็นเครื่องหมักแบบคอลัมน์ (อำนวย สุขเหมือน, 2521) ดังรูปที่ 3.1 ซึ่งแบ่งได้ออกเป็น 4ส่วน คือ เครื่องป้อนอากาศ หัวกระจายอากาศ คอลัมน์สำหรับหมักและระบบกันฟองล้น ระบบการหมุนเวียนของน้ำหมัก

3.1.1 เครื่องป้อนอากาศ

ประกอบด้วยเครื่องอัดอากาศ (หมายเลข 1 รูปที่ 3-1) ซึ่งจะให้อัตราการไหลของอากาศคงที่ได้โดยมีเครื่องปรับความดัน (หมายเลข 2; ติดอยู่กับตัวเครื่อง อากาศจะผ่านเข้าเครื่องกรองอากาศ (หมายเลข 3) ซึ่งใช้สำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้ออัดกันอยู่แบบหลวม ๆ ในกรวยทรงกลมและเข้าเครื่องวัดอัตราการไหลของอากาศ (หมายเลข 4) แล้วผ่านหัวกระจายอากาศ (หมายเลข 5) ซึ่งวางอยู่ตอนล่างตรงกลางคอลัมน์ห่างจากฐานคอลัมน์ (H_2) 8.0 เซนติเมตร

3.1.2 หัวกระจายอากาศ

หัวกระจายอากาศที่ใช้มี 6 แบบด้วยกันคือ

- แบบตะแกรงโลหะทำด้วยเหล็กแสตนเลสขนาด 40 ตา (รูปที่ 3-2 ก,ข)

– แบบตะแกรงโลหะทำด้วยแสตนเลสขนาด 40 ตา ที่บรรจุลูกแก้วขนาด 2.0 มิลลิเมตร (รูปที่ 3–2 ค,ง)

– แบบแผ่นโลหะเจาะรูทำด้วยเหล็กแสตนเลส (รูปที่ 3–3 ก, ข)

– แบบแผ่นโลหะเจาะรูทำด้วยเหล็กแสตนเลสบรรจุลูกแก้วขนาด 2.0 มิลลิเมตร (รูปที่ 3–3 ค, ง)

– แบบแผ่นแก้วรูพรุน (รูปที่ 3–4 ก,ข)

– แบบทรงกลมรูพรุน (รูปที่ 3–4 ค)

หัวกระจายแบบบรรจุลูกแก้ว ได้แบบอย่างมาจากเรื่องของ Liquid and Gas Fluidization (Leva, 1951)

3.1.3 คอลัมน์สำหรับหมักและระบบกันฟองล้น

คอลัมน์ที่ใช้ทำด้วยแก้ว (หมายเลข 9 รูปที่ 3–1) วางในแนวดิ่ง มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน (D) 8.7 เซนติเมตร ความสูง (H) 120.0 เซนติเมตร มีความจุ 10,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนระบบกันฟองล้น (หมายเลข 7) ประกอบด้วยท่อพลาสติกให้ฟองล้นขึ้นมาจากคอลัมน์แล้วเข้าสู่กรวยแก้วรูปทรงกลมซึ่งมีความจุ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะให้น้ำหมักที่ติดมากับฟองไหลกลับลงสู่คอลัมน์

3.1.4 ระบบการไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก

ระบบนี้ประกอบด้วยส่วนที่เป็นท่อป้อนย้อนกลับ (หมายเลข 6 รูปที่ 3–1) และกรวยป้องกันอากาศเข้าท่อป้อนย้อนกลับ การไหลหมุนเวียนของน้ำหมัก เกิดจากความแตกต่างของความหนาแน่นของน้ำหมักในท่อป้อนย้อนกลับ (หมายเลข 6) กับน้ำหมักผสมอากาศซึ่งน้อยกว่าในคอลัมน์ ท่อป้อนย้อนกลับส่วนที่อยู่ในคอลัมน์ทำด้วยท่อแสตนเลสเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.7 เซนติเมตร วางอยู่ในแนวดิ่งที่ปลายล่างยึดติดกับถ้วย

รูปกรวยทำด้วยพลาสติกทนกรดด่าง (หมายเลข 8) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.5 เซนติเมตร สูง 11.0 เซนติเมตร ถ้วยนี้กันไม่ให้อากาศไหลเข้าท่อป้อนย้อนกลับ ซึ่งหากมีอากาศเข้าได้จะทำให้การไหลในท่อป้อนย้อนกลับชงักได้ ปลายของท่อป้อนย้อนกลับจะอยู่สูงจากฐานคอลัมน์ (H_1) 68.0 เซนติเมตร ท่อป้อนย้อนกลับส่วนที่อยู่นอกคอลัมน์ เป็นท่อพลาสติก เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ ท่อป้อนย้อนกลับส่วนที่อยู่ในคอลัมน์ ท่อป้อนนอกคอลัมน์นี้ต่อกับท่อป้อนในคอลัมน์ที่โผล่เหนือฝาปิดคอลัมน์ตอนบน (H_3) 6.0 เซนติเมตรมีวาล์วปิดเปิดเพื่อดูดอากาศออกทำให้เริ่มการไหลหมุนเวียน ปลายล่างของท่อป้อนย้อนกลับจะอยู่สูงจากฐานคอลัมน์ (H_4) 9.0 เซนติเมตร

3.2 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนจากฟองอากาศลงสู่น้ำ

ในการหาอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนจากฟองอากาศลงสู่น้ำในที่นี้เป็นการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการให้อากาศของหัวกระจายแต่ละแบบอันประกอบด้วย แบบทรงกลมรูพรุน แบบแผ่นแก้วรูพรุน แบบตะแกรงโลหะ แบบแผ่นโลหะเจาะรู แบบตะแกรงโลหะบรรจุลูกแก้ว แบบแผ่นโลหะเจาะรูบรรจุลูกแก้ว

3.2.1 วิธีปฏิบัติการ

ใส่โซเดียมซัลไฟท์ (Na_2SO_3) หนัก 190 กรัม ลงในถังที่มีน้ำกลั่นปรับพีเอช 4.0 อยู่ 6.0 ลิตร กวนให้ละลาย แล้วเทใส่เครื่องหมักคอลัมน์ที่ได้เปิดอากาศเข้าไปแล้วเล็กน้อย เพื่อป้องกันน้ำเข้าไปในหัวกระจายอากาศปรับอัตราการให้อากาศตามที่ต้องการ แล้วเริ่มให้มีการไหลหมุนเวียน ด้วยการดึงอากาศออกจากท่อป้อนย้อนกลับแล้วรีบปิดวาล์วทันที เติมคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 5H_2O$) ลงในคอลัมน์ 1 กรัม เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกริยา ดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์พร้อมกับเริ่มจับเวลา

3.2.2 วิธีการวิเคราะห์

วัดอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนจากฟองอากาศลงสู่น้ำด้วยวิธีของซัลไฟท์ออกซิเดชั่น โดยดึงตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณซัลไฟท์ทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง ครั้งละ 2.5 มิลลิลิตรโดยเติมสารละลายมาตรฐานไอโอดีน 0.1 นอร์มอลลงไป 15.0 มิลลิลิตรจนเกินพอ เจือจางให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วไตเตรตกับสารละลายโซเดียวไทโอซัลเฟตมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล ไตเตรตจนกระทั่งสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด เติมน้ำแป้งลงไป 2 มิลลิลิตร ไตเตรตจนสีหายไป ในการไตเตรตเป็นการหาปริมาณไอโอดีนที่เหลือจากทำปฏิกริยากับซัลไฟท์ในตัวอย่าง นำค่าปริมาณไอโอดีนที่เหลือไปลบออกจากปริมาณไอโอดีนทั้งหมด จะทราบปริมาณไอโอดีนที่ทำปฏิกริยาพอดีกับซัลไฟท์ ทำให้สามารถคำนวณหาค่าซัลไฟท์แต่ละช่วงของการทดลองได้ ค่าที่หายไปแสดงว่าซัลไฟท์ทำปฏิกริยากับออกซิเจนที่ละลายลงสู่น้ำ ทำให้คำนวณอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนลงสู่น้ำได้

3.3 การผลิตยีสต์ (Candida utilis)

3.3.1 เชื้อยีสต์ที่ใช้

ในการศึกษานี้ได้ใช้ยีสต์ C. utilis ในรูปยีสต์บริสุทธิ์นำมาถ่ายเชื้อเก็บไว้ใน โปเต้า เด็กโตรส เอการ์ (Potato Dextrose Agar) และเก็บไว้ในตู้เย็น 10° ซ. จนกว่าจะนำมาใช้

3.3.2 การเตรียมน้ำสับปะรด

นำผลสับปะรดที่เอาจุกออกแล้ว มาล้างด้วยน้ำประปาแล้วปอกเปลือกพร้อมกับเอาก้านและแกนในออก ล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้งหนึ่ง หั่นเนื้อสับปะรดให้เป็น

ชิ้นเล็ก ๆ นำเข้าเครื่องตีป่น หลังจากนั้นกรองแยกส่วนที่เป็นกากออกด้วยผ้าขาวกรอง ใช้เครื่อง ไฮดรอลิคเพรส ช่วยในการกรอง น้ำสับปะรดที่ได้วัดหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลโดยประมาณ เป็นองศาบริกซ์ด้วยการใช้รีแฟรคโตมิเตอร์ Atago No 466138 จะมีค่าอยู่ระหว่าง 12-16 องศาบริกซ์ และหาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่แน่นอนอีกครั้งหนึ่งตามวิธีของ Lane-Ennon (Pearson, 1970) เติมน้ำกลั่นเพื่อเจือจางน้ำสับปะรดให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาล 2.0 % น้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสารอาหารสำหรับการเลี้ยงยีสต์

3.3.3 การเตรียมสารอาหารและสารอาหารเสริม

สารอาหารซึ่งเป็นน้ำสับปะรดที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำตาลความเข้มข้น 2.0 % นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชั้นที่ 121°ซ. นาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง สำหรับสารอาหารเสริมในการผลิตยีสต์ได้ใช้โปตัสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ อย่างละ 0.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นสารเกรดบริสุทธิ์ ทำการฆ่าเชื้อโดยบรรจุในภาชนะที่แยกกันด้วยความร้อนชั้นที่ 121°ซ. นาน 15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง สารอาหารเสริมในที่นี้ได้เตรียมในรูปของสารละลายโปตัสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและไดแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 60.0 และ 50.0 % น้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ

3.3.4 การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

ใช้เชื้อหมักเริ่มต้น 20 % โดยปริมาตรของน้ำหมักทั้งหมดในการเตรียมใช้น้ำสับปะรดที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำตาลความเข้มข้น 2.0 % บรรจุใส่ขวดรูปกรวย ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ปิดจุกขวดด้วยสำลีและหุ้มรอบนอกด้วยแผ่นอลูมิเนียมบางอีกชั้นหนึ่ง นำไปฆ่าเชื้อที่ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที

ทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง เติมสารอาหารเสริมโปตัสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและ . แอมโมเนียมซัลเฟต เกรดบริสุทธิ์อย่างละ 0.5 % ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121° ซ. นาน 15 นาที และเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อที่กำลังเจริญเติบโตดี ลงไป (ขวดละ 1 ลูป) ซึ่งเตรียมจากการเขี่ยเชื้อต่อเนื่องกัน 2 ครั้ง ลงในหลอดที่มี โปเตโต้ เด็กโตรส เอการ์ จากเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นแต่ละครั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งการเติมอาหารเสริมและการเติมเชื้อต้องทำด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3.3.5 การเตรียมเครื่องหมักและอื่น ๆ

คอลัมน์แก้ว หัวกระจายอากาศ ท่อพลาสติกต่าง ๆ ของเครื่องหมัก ทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายฟีนอล 5% โดยปริมาตรของ Liquefied Phenol B.P. 1973, Srichand United Dispensary Ltd. Partnership เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้ว โดยล้าง 2 ครั้ง เครื่องกรองอากาศซึ่งเป็นกรวยแก้วบรรจุสำลีอยู่ภายในและกรวยป้องกันฟองล้น ทำการฆ่าเชื้อด้วยการอบด้วยความร้อนแห้งที่ 180° ซ. นาน 2 ชั่วโมง สารกำจัดฟองใช้ 10 % โดยปริมาตรของ Silicone antifoam, I.C. Enterprise Bangkok ทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121° ซ. นาน 15 นาที

3.3.6 วิธีปฏิบัติการ

เมื่อเริ่มการทดลองจะเปิดให้อากาศผ่านหัวกระจายอากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที ไว้ก่อน แล้วเติมสารอาหารลงในคอลัมน์

ทางกรวยของระบบกันฟองล้น (หมายเลข 7 ในรูปที่ 3.1) ประมาณ 4 ลิตร ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำสับปะรด ซึ่งใช้เป็นสารอาหารไหลเข้าไปในหัวกระจายอากาศ หลังจากนั้นเติมสารอาหารเสริมและโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 % เพื่อปรับพีเอชให้ได้ 4.0 แล้วเติมเชื้อหมักเริ่มต้นลงไป เติมสารอาหารส่วนที่เหลือเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 6.0 ลิตร ดูดอากาศออกจากท่อป้อนย้อนกลับ (หมายเลข 6 รูปที่ 3.1) ทางวาล์วปิดเปิดเพื่อให้น้ำหมักเริ่มไหลวน เมื่อน้ำหมักไหลวนแล้วรีบปิดวาล์วทันที เพื่อไม่ให้อากาศเข้าไปอีก ซึ่งจะทำให้การไหลวนหยุดชะงักได้ เริ่มจับเวลาพร้อมกับดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ปรับพีเอชใหม่ให้ได้ 4.0 ในการปรับพีเอชใช้ PH meter, Prolabo type V8N Serial K3 No 35783 ซึ่งจะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทั้งหมด 5-10 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ค่าสภาพการดูดกลืนแสงประมาณ 1 ในกรณีที่ค่าสภาพการดูดกลืนแสงต่างไปจาก 1 มาก ในการทดลองจะมีปัญหาเรื่องฟองเกิดขึ้นมากในระหว่างการเติมสารอาหารเริ่มต้น หรือในขณะทำการหมัก โดยเฉพาะช่วงที่เซลล์กำลังเจริญเต็มที่ ทำการกำจัดฟองให้น้อยลงด้วยการใช้สารกำจัดฟองซิลิโคน (Silicone antifoam) 10% ในการเติมสารกำจัดฟองจะพยายามเติมให้น้อยที่สุดพอทำลายฟอง โดยการเติมทีละหยดสองหยด เมื่อมีฟองเกิดขึ้นมาก จะใช้สารกำจัดฟองในแต่ละครั้งของการทดลอง 0.5-2 มิลลิลิตร มีการปรับพีเอชของน้ำหมักให้ได้ 4.0 ทุก ๆ ชั่วโมง เพราะเมื่อมีการหมักพีเอชของน้ำหมักจะลดลงเรื่อย ๆ สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเป็นอุณหภูมิห้อง 29-34° ซ.

3.3.7 <u>การทดลอง</u>

การทดลองผลิตยีสต์ (C. <u>utilis</u>) โดยใช้เครื่องหมักแบบคอลัมน์ ได้ใช้อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที กับหัวกระจายอากาศแบบต่าง ๆ กัน ดังนี้

- หัวกระจายอากาศแบบแผ่นแก้วรูพรุน
- หัวกระจายอากาศแบบทรงกลมรูพรุน
- หัวกระจายอากาศแบบแผ่นโลหะเจาะรู
- หัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะ
- หัวกระจายอากาศแบบแผ่นโลหะเจาะรูบรรจุลูกแก้ว
- หัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะบรรจุลูกแก้ว

3.3.8 วิธีการวิเคราะห์

3.3.8.1 วัดค่าสภาพการดูดกลืนแสง (Absorbance) (Vananuvat and Kinsella, 1975) โดยใช้เครื่องสเปคโทรนิค 20 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Baush & Lomb ที่ช่วงคลื่น 500 นาโนเมตร เป็นการวัดความเข้มข้นของเซลล์ โดยทางอ้อมแสดงค่าในเทอมของสภาพการดูดกลืนแสง ใช้สารอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วเป็นแบล้งค์ในกรณีที่น้ำหมักมีความเข้มข้นของเซลล์มากจะทำให้เจือจางลงโดยน้ำกลั่นให้อ่านค่าสภาพการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.6

3.3.8.2 วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (Vananuvat and Kinsella, 1975) ใช้น้ำหมัก 25 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 740 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำเก็บในขวดตัวอย่างปิดฝาเก็บไว้ในตู้แช่เย็น เพื่อเอาไปวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และค่าการลดลงของซีโอดี ส่วนที่เป็นเซลล์เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร กวนให้เซลล์กระจายใหม่นำเข้าเครื่องเหวี่ยงอีก 30 นาทีรินเอาน้ำออก ส่วนเซลล์ที่เหลือนำไปเข้าเครื่องอบแห้งที่ 100° ซ. นาน 2 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่

3.3.8.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำสับปะรดใช้วิธีของ Lane-Ennon (Pearson, 1970) แสดงปริมาณน้ำตาลเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของอินเวิร์ท ชูก้าร์ (Invert sugar) น้ำยาเคมีประกอบด้วยสารละลายเฟห์ลิ่ง สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 % น้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายฟีนอลทาลีน 1% น้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายเมทิลลีนบูล 1% น้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายน้ำแป้ง 1% น้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายเฟห์ลิ่งประกอบด้วยเฟห์ลิ่ง เอ และเฟห์ลิ่งบีผสมกันอย่างละ 12.5 มิลลิลิตรแล้วใช้ทันที เฟห์ลิ่ง เอ ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 5H_2O$) 69.278 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วทำปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เฟห์ลิ่ง บี ประกอบด้วย โปตัสเซี่ยม โซเดียม ทาร์เตรท (โรเชลท์ ซอลท์) 346 กรัม โซเดียมไฮดรอไซด์ 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วทำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เฟห์ลิ่ง บีนี้เวลาเตรียมแต่ละครั้งต้องทิ้งไว้ 2 วันก่อนใช้งานได้

ในการวิเคราะห์น้ำตัวอย่างน้ำสับปะรดมาย่อยน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ให้เป็นอินเวิร์ทชูก้าร์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟลุกโตส อย่างละเท่า ๆ กัน โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล 15 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้150 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดด้วยกระจกนาฬิกาแล้วต้มให้เดือดนับเวลาการเดือด 2 นาที หลังจากทำให้เย็นแล้ว ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เรียกสารละลายที่ได้นี้ว่าสารละลายน้ำตาล

การวิเคราะห์แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ตอนแรกเรียกว่าการไตเตรทขั้นต้น โดยใช้ 25 มิลลิลิตรของเฟห์ลิ่ง เอ และเฟห์ลิ่ง บี ผสมกันอย่างละเท่า ๆ กัน คืออย่างละ 12.5 มิลลิลิตร หลังจากผสมแล้วต้องใช้ทันที ทำการไตเตรทกับสารละลายน้ำตาล โดยเติมสารละลายน้ำตาลลงในขวดเฟห์ลิ่งก่อน 15 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นับเวลาจากเริ่มเดือดไป 2 นาที แล้วเติมสารละลายเมทิลลีนบูลลงไป 3-5 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์

ทำการไตเตรทกับสารละลายน้ำตาลต่ออย่างรวดเร็ว เพื่อให้ทราบปริมาตรของสารละลายน้ำตาลที่พอดีทำปฏิกริยากับสารละลายเฟห์ลิ่ง 25 มิลลิลิตร อย่างคร่าว ๆ จุดสุดท้ายของการไตเตรทคือจุดที่สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงอิฐโดยสมบูรณ์ การไตเตรทขั้นที่สองเป็นการไตเตรทอย่างละเอียด ทำแบบเดียวกับการไตเตรทขั้นต้นเพียงแต่แทนที่จะใช้สารละลายน้ำตาล 15 มิลลิลิตรเติมในสารละลายเฟห์ลิ่งก่อนการนำไปต้น ก็ใช้ปริมาตรที่น้อยกว่าที่ทำปฏิกริยาพอดีกับสารละลายเฟห์ลิ่งตอนแรกเล็กน้อย (น้อยกว่าประมาณ 2–5 มิลลิลิตร) ในการไตเตรทต้องให้แล้วเสร็จภายใน 3 นาที ของการเดือดทั้งหมด เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ ควรจะควบคุมเรื่องความร้อนที่ใช้ในการต้มสารละลายให้เท่ากันทุกครั้ง ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลนั้นต้องอาศัยตารางในภาคผนวกที่ 2 ในการวิเคราะห์ต้องให้ได้สารละลายน้ำตาลที่อยู่ในช่วง 15–50 มิลลิลิตร ถ้ายังไม่ได้ต้องเริ่มต้นจากเลือก **ปริมาณตัวอย่างใหม่ให้เหมาะสมกับสารละลายเฟห์ลิ่งผสม** 25 มิลลิลิตร

3.3.8.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมัก (Stiles et al., 1926) เนื่องจากวิธีของ Lane-Ennon นั้นใช้ได้กับในกรณีที่มีค่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลค่ามาก ๆ ส่วนปริมาณน้ำตาลในน้ำหนักในการผลิตยีสต์นี้มีค่าน้อยจึงใช้วิธีของ Stiles et al. ได้ผลดีกว่า น้ำยาเคมี ประกอบด้วย คอมไบน์ ไมโครรีเอเย็นต์ (Combined microreagent) กรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล โซเดียมไทโอซัลเฟต 0.002 นอร์มอล สารละลายน้ำแป้ง 1.0 % น้ำหนักต่อปริมาตร คอมไบน์ ไมโครรีเอเย็นต์ประกอบด้วย คอปเปอร์ ซัลเฟต ($CuSO_4 5H_2O$) โซเดียม โปตัสเซี่ยม ทาร์เตรท โซเดียมคาร์บอเนต (ไม่มีน้ำ) โปตัสเซี่ยม ไอโอไดด์ โปตัสเซี่ยมไอโอเดต และโปตัสเซี่ยม ออกซาเลต อย่างละ 0.5, 7.5, 40.0, 10.0, 0.7 และ 18.4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

การวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างที่มีอินเวิร์ท ชูก้าร์ในช่วง 30–70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในขวดจุกเกลียวย่อยสลายให้เป็นอินเวิร์ท ชูก้าร์ ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร โดยแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 70° ซ. นาน 10 นาที เมื่อเย็นแล้วทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 % ปิเปตไมโครริเอเย็นต์ลงไป 5 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียวต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 15 นาที เมื่อเย็นแล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที แล้วไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต มาตราฐาน 0.002 นอร์มอล จนได้สีเหลืองอ่อน จึงเติมสารละลายน้ำแป้ง 1 % ลงไป 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหายไปอย่างถาวร ทำในแบล้งค์เช่นเดียวกันโดยใช้ 5 มิลลิลิตรของน้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ค่าแตกต่างระหว่างแบล้งค์และที่อ่านได้จากตัวอย่าง นำไปหาปริมาณน้ำตาลได้จากตารางในภาคผนวกที่ 2

3.3.8.5 วิเคราะห์หาปริมาณการลดลงของ ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand เขียนคำย่อว่า COD) (Porges et al. 1950) น้ำยาเคมีที่ใช้มีโปตัสเซียมไดโครเมท 2.5 กรัม ละลายใน ของผสมระหว่าง กรดซัลฟูริกเข้มข้นและ 85 % กรดฟอสฟอริก อย่างละ 500 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้กรองผ่านใยแก้ว (glass wool) ก่อนใช้ สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์ 1.241 % น้ำหนักต่อปริมาตร สารละลายน้ำแป้งแบบเดียวกับที่ใช้ข้างต้น

การวิเคราะห์ใช้สารละลายไดโครเมท 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างที่มีซีโอดีอยู่ประมาณ 100 ส่วนในล้านส่วน เขย่าแล้วนำไปตั้งบนเตาไฟฟ้าที่มีเครื่องกวนแม่เหล็กควบคุมปริมาณความร้อนซึ่งจะทำให้สารละลายมีอุณหภูมิถึง 165–175° ซ ภายในเวลา 5–6 นาที เมื่ออุณหภูมิถึงแล้วนำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำลงไป 200 มิลลิลิตร แช่น้ำเย็นแล้วเติมสารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตราฐานไทโอซัลเฟต 0.05 นอร์มอลจนสีเหลืองอ่อน

เติมสารละลายน้ำแป้งลงไป 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อจนสีน้ำเงินหายไป ทำแบล้งค์ แล้วหาความแตกต่างของปริมาณไทโอซัลเฟตที่ใช้กับแบล้งค์และตัวอย่าง คำนวณหาค่าซีโอดีในหน่วยของมิลลิกรัมต่อลิตร หรือส่วนในล้านล้านได้โดยสูตร

$$\text{ซีโอดี} = \frac{D \times 0.05 \times 8 \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง}}$$

3.3.8.6 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1975) โดยหาจากจำนวนไนโตรเจน × 6.25 (Worgan, 1943) ขนาดของตัวอย่างที่ใช้จะมีโปรตีนอยู่ระหว่าง 10–20 มิลลิกรัม ในการย่อยสลาย ใช้ขวดไมโครเคดาร์ (micro-kjeldahl flask) กรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ใช้ตัวเร่งประกอบด้วยโปตัสเซี่ยมซัลเฟต 1.9 กรัม และเมอร์คิวริก-ออกไซด์ 40 มิลลิกรัม ใช้ความร้อนช่วยในการย่อยทำในตู้ดูดควัน เพราะขณะย่อยจะมีควันเกิดขึ้นมาก ทำการย่อยจนได้สารละลายที่ใส แล้วนับเวลาต่อไปอีก 30 นาที นำมาล้างใส่ขวดกลั่นจัดชุดกลั่นให้พร้อม แล้วเติมลงไปทีละน้อยของ 20 มิลลิลิตรของสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์–โซเดียมไทโอซัลเฟต (ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และไทโอซัลเฟต $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วทำปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) รองรับส่วนที่กลั่นออกมาด้วย กรดบอริก 4% น้ำหนักต่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร หาปริมาณของไนโตรเจนได้ด้วยการนำส่วนที่กลั่นมาได้ไปไตเตรทกับกรดไฮโดรคลอริคมาตรฐาน 0.02 นอร์มอล มีเมทิลลีน บูล–เมทิลเรด เป็นอินดิเคเตอร์ (ผสม 2 ส่วนของสารละลายเมทิลเรด 0.2 % ในแอลกอฮอล์ กับ 1 ส่วนของสารละลายเมทิลลีน บูล 0.2% ในแอกอฮอล์) จุดสุดท้ายของการไตเตรท สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียนเป็นสีม่วง ทำเทียบกับแบล้งค์แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนของยีสต์ที่หาได้จะรวมทั้งไนโตรเจนที่มีในโปรตีนกรดนิวคลิก (nucleic acids) ผนังเซลล์ และยังรวมทั้งไนโตรเจนจากสารประกอบทางอนินทรีย์ด้วย และปริมาณโปรตีนที่หาได้นี้เรียกว่า เคลาร์โปรตีน (Kjeldahl protein) หรือเคโปรตีน (K-Protein) (Vananuvat and Kinsella, 1975)

3.4 การผลิตเอทานอล

เชื้อยีสต์ที่ใช้คือ Saccharomyces ellipsoideus ในรูปยีสต์บริสุทธิ์นำมาถ่ายเชื้อเก็บไว้ในโปเตโต้ เด็กโตรส เอการ์ และเก็บไว้ในตู้เย็น 10° ซ. จนกว่าจะนำมาใช้ได้ใช้น้ำสับปะรดเป็นสารอาหารสารอาหารเสริมที่ใช้คือ ไดโปตัสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟตเกรดบริสุทธิ์อย่างละ 0.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตรของการทดลองใช้น้ำหมัก 6.0 ลิตร เชื้อหมักเริ่มต้นใช้ 5% โดยปริมาตรของน้ำหมักทั้งหมด พีเอชของการทดลองควบคุมให้ได้ 4.5 ในการปรับพีเอชอาจจะใช้กรดซัลฟูริก 2 นอร์มอลหรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% และในการปรับพีเอชใช้เครื่องวัด PH meter, Prolabo type V8N Serial-K3 No 35783 อุณหภูมิของการทดลองใช้อุณหภูมิห้อง 25-30° ซ. สารกำจัดฟองใช้ซิลิโคน 10 % แบบเดียวกับที่ใช้ในการผลิตยีสต์

การเตรียมน้ำสับปะรด การเตรียมสารอาหารสารอาหารเสริม การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น การเตรียมเครื่องหมักและอื่น ๆ ตลอดจนวิธีการปฏิบัติการจะทำแบบเดียวกับในการผลิตยีสต์ข้างต้น จะมีต่างกันตรงรายละเอียดเล็ก ๆ น้อย ๆ ซึ่งจะได้กล่าวไว้ต่อไปคือ การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น ได้ใช้ปริมาตรของสารอาหาร 100 มิลลิลิตร ต่อ 1 ขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.1 การทดลอง

ได้แบ่งการทดลองออกเป็น

3.4.1.1 การทดลองเพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ

S. ellipsoideus เมื่อให้อากาศในอัตรา 0.5, 1.0 และ 1.5 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที กับหัวกระจายอากาศแบบแผ่นแก้วรูพรุน ทรงกลมรูพรุน และแบบตะแกรงโลหะ สารอาหารที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ใช้น้ำสับปะรดผสมน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ โดยใช้น้ำตาลจากน้ำสับปะรด 5.0 องศาบริคซ์ และน้ำตาลทราย 10.0 องศาบริคซ์ รวมเป็น 15.0 องศาบริคซ์ สารอาหารและสารอาหารเสริมที่ใช้รวมทั้งสารกำจัดฟองได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีความร้อนชื้นที่ 121° ซ. นาน 5 นาที ได้ใช้เวลาของการทดลอง 10 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นจัดให้มีค่าสภาพการดูดกลืนแสง 0.34-0.36 ได้ใช้สารซิลิโคนกำจัดฟองแต่ละการทดลอง 5-15 มิลลิลิตร

3.4.1.2 การทดลองผลิตเอทานอล จากการทดลองตามหัวข้อ 3.4.1.1 ทำให้สามารถเลือกหัวกระจายอากาศเวลาการให้อากาศและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมได้ ดังนั้นได้เลือกหัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะ ให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที เวลาการให้อากาศ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เชื้อหมักให้มากสำหรับการหมักแบบไม่ให้อากาศและให้เอทานอลออกมาหลังจากหยุดการให้อากาศกับเชื้อหมักในการทดลองนี้ ได้ใช้น้ำสับปะรดผสมกับน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ในอัตร่วนต่าง ๆ กันเป็นสารอาหาร โดยให้มีน้ำตาลความเข้มข้นทั้งหมด 20.0 องศาบริคซ์ อัตราส่วนน้ำตาลจากน้ำสับปะรดต่อน้ำตาลจากน้ำตาลทรายที่ใช้มีดังนี้ 2.5 : 17.5, 5.0 : 15.0, 7.5 : 12.5 และ 14.0 : 6.0 องศาบริคซ์ อัตราส่วนอันสุดท้ายได้ใช้น้ำสับปะรดล้วน ๆ ไม่มีการทำให้เจือจางด้วยน้ำ

หน่วยของน้ำตาลที่ใช้ในที่นี้เป็นองศาบริคซ์ สารอาหารเสริม และสารกำจัดฟองที่ใช้ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121° ซ. นาน 5 นาที และได้ใช้สารกำจัดฟองซิลิโคน 1-5 มิลลิลิตร

3.4.1.3 การทดลองผลิตเอทานอล โดยใช้หัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะ ให้อากาศในอัตรา 0.5 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์เชื้อหมักในช่วงแรกของการทดลอง สารอาหารที่ใช้เป็นน้ำสับปะรดผสมกับน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ในอัตราส่วน 7.5 : 12.5 องศาบริคซ์ตามลำดับ ได้ทำการทดลองกับสารอาหาร สารอาหารเสริมที่ผ่านขบวนการเตรียม 3 วิธีด้วยกัน ดังนี้

3.4.1.3.1 เมื่อใช้สารอาหารและสารอาหารเสริมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนชื้นที่ 121° ซ. เป็นเวลา 5 นาที

3.4.1.3.2 เมื่อใช้สารอาหารและสารอาหารเสริมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอไรซ์ที่ 70° ซ. เป็นเวลา 10 นาที

3.4.1.3.3 เมื่อใช้สารอาหารและสารอาหารเสริมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ทั้งสิ้น

สำหรับสารกำจัดฟองซิลิโคนที่ใช้ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อใด ๆ ทั้งสิ้น และแต่ละการทดลองจะใช้สารกำจัดฟอง 0.5-2.5 มิลลิลิตร

3.4.2 วิธีการวิเคราะห์

3.4.2.1 วัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อหมัก วัดจากค่าสภาพการดูดกลืนแสง (Absorbance) ตามหัวข้อ 3.3.8.1

3.4.2.2 ปริมาณน้ำตาลในน้ำสับปะรดและในน้ำหมักใช้วิธีของ Lane-Ennon ตามหัวข้อ 3.3.8.3

3.4.2.3 ปริมาณแอลกอฮอล์ (เอทานอล) ในน้ำหมัก (A.O.A.C., 1975) ใช้น้ำหมัก 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นขนาด 250-500 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไปอีก 50 มิลลิลิตร นำไปกลั่น กลั่นให้ได้ส่วนที่กลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปหาค่าความถ่วงจำเพาะโดยใช้ขวดหาความถ่วงจำเพาะ (Pycnometer) ขนาด 25 มิลลิลิตร จากค่าความถ่วงจำเพาะที่ได้นำไปหาค่าปริมาณของเอทานอลเป็นเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจากตารางในภาคผนวกที่ 3 กรณีที่น้ำหมักมีความเป็นกรดผิดปกติเนื่องจากกรดอะซีติกทำให้น้ำหมักเป็นกลางด้วย 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนนำไปกลั่น

3.5 การผลิตกรดอะซีติก

การผลิตกรดอะซีติก ในการทดลองได้ใช้เชื้อ Acetobacter aceti เลี้ยงเก็บเชื้อไว้ใน อะซีโตแบคเทอร์ เอก้าร์ (Toshinobu Asia, 1968) และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10° ซ สารอาหารที่ใช้เป็นน้ำหมักเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอล ได้ใช้น้ำหมักที่มีเอทานอลเริ่มต้น 6.0 % โดยปริมาตรอาหารเสริมที่ใช้ประกอบด้วย ยีสต์ - เอ็กแทรคท์ (Yeast Extract) เปปโทน (Peptone) แมนนิทอล (Mannitol) ของ Difco Laboratories และไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เกรดบริสุทธิ์ 0.05, 0.03, 0.25 และ 0.5 % น้ำหมักต่อปริมาตร ตามลำดับ ปริมาตรของการทดลองใช้ 8.0 ลิตร อุณหภูมิของการทดลองใช้อุณหภูมิห้อง 29-34° ซ ไม่มีการปรับพีเอชหรือความเป็นกรดด่างตอนเริ่มต้นการทดลอง สารกำจัดฟองใช้ซิลิโคน 10 % แบบเดียวกับที่ใช้ในการผลิตยีสต์

3.5.1 การเตรียมสารอาหารและอาหารเสริม

สารอาหารที่ใช้ เตรียมจากน้ำหมักเอทานอลที่ได้จากการผลิตเอทานอล โดยเก็บไว้ในขวดขนาด 50 ลิตร ที่มีฝาปิด เพื่อให้เซลล์ของยีสต์ตกตะกอนแล้วดูดเอาน้ำหมักส่วนที่ใส ซึ่งมีเอทานอลอยู่ประมาณ 10% นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้เปอร์เซ็นต์เอทานอลตามที่ต้องการ นำไปฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 65–70° ซ. นาน 10 นาที ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องโดยการแช่น้ำ สารอาหารเสริม ยีสต์เอ็กแทรคท์ เปปโทนและแมนนิทอล เตรียมในขวดเดียวกันในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 65–70° ซ. นาน 10 นาที ปิดจุกขวดด้วยสำลีทำให้เย็นด้วยการแช่น้ำให้ถึงอุณหภูมิห้อง ส่วนไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) เตรียมเป็นสารละลาย 25.0 % น้ำหนักต่อปริมาตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 65–70° ซ นาน 10 นาที ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องโดยการแช่น้ำ

3.5.2 การเตรียมเชื้อหมักเริ่มต้น

ได้ใช้เชื้อหมักเริ่มต้น 20 % โดยปริมาตรของน้ำหมักทั้งหมด ในการเตรียมได้ใช้น้ำหมักเอทานอล ส่วนที่ใสที่ใช้กับการเตรียมสารอาหารข้างต้นมาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้เอทานอล 6.0 % นำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่ 65–70° ซ นาน 10 นาที แล้วถ่ายขณะร้อนใส่ขวดรูปกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบแห้งที่ 180° ซ นาน 2 ชั่วโมง พร้อมกับปิดจุกขวดด้วยสำลี ขณะที่ถ่ายต้องทิ้งขวดไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องก่อน เติมสารอาหารเสริมไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % ที่เพิ่งผ่านการฆ่าเชื้อลงไปแล้วทำให้เย็นโดยการแช่ขวดในน้ำจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วถ่ายเชื้อ (broth) ที่เตรียมจากสารอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

ที่เขี่ยเชื้อจากเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นแล้วทิ้งไว้ให้เชื้อเจริญโตในสารอาหารเหลวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้สารอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อนี้ 10 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตามวิธีของRichardson, K.C. (1967) สารอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย ยีสต์เอ็กแทรคท์, เปปโทน, แมนนิทอล อย่างละ 0.5, 0.3 และ 2.5 % น้ำหมักต่อปริมาตรตามลำดับในน้ำกลั่น

3.5.3 การเตรียมเครื่องหมักและอื่น ๆ

ทำตามหัวข้อ 3.3.5 มีเพิ่มเติมตรงสารกำจัดฟองที่ใช้ซิลิโคน 10 % ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการต้มที่ 65-70° ซ นาน 10 นาที

3.5.4 วิธีปฏิบัติการ

ทำตามหัวข้อ 3.3.6 ต่างกันตรงตอนเริ่มการทดลองใช้อากาศผ่านหัวกระจายอากาศเพียง 0.2 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที แล้วเติมสารอาหารลงไปในคอลัมน์ 6 ลิตร ตามด้วยสารอาหารเสริม เชื้อหมักเริ่มต้น แล้วเติมสารอาหารที่เหลือปรับปริมาตรให้ได้ 8.0 ลิตร จัดค่าสภาพการดูดกลืนแสงเริ่มต้นให้ได้ประมาณ 0.1 ไม่มีการเติมกรดด่างเพื่อปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ในการทดลองนี้ได้ใช้สารกำจัดฟองซิลิโคนระหว่าง 50-300 มิลลิลิตร

3.5.5 การทดลอง

ได้ทำการทดลองผลิตกรดอะซีติก โดยใช้หัวกระจายอากาศแบบตะแกรงโลหะขนาด 40 ตา ที่อัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที

3.5.6 วิธีการวิเคราะห์

3.5.6.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อหมัก วัดจากค่าสภาพการดูดกลืนแสง (Absorbance) ตามหัวข้อ 3.3.8.1

3.5.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำหมักแสดงในรูปของกรดอะซีติกเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหมักต่อปริมาตร (AOAC, 1975) ใช้ตัวอย่างน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร โดยปิเปตใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี เติมฟีนอลทาลีน 1% ลงไป 2 หยด แล้วไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน 0.5 นอร์มอล

3.5.6.3 การวัดปริมาณเอทานอลในน้ำหมักทำตามหัวข้อ 3.4.2.3