บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

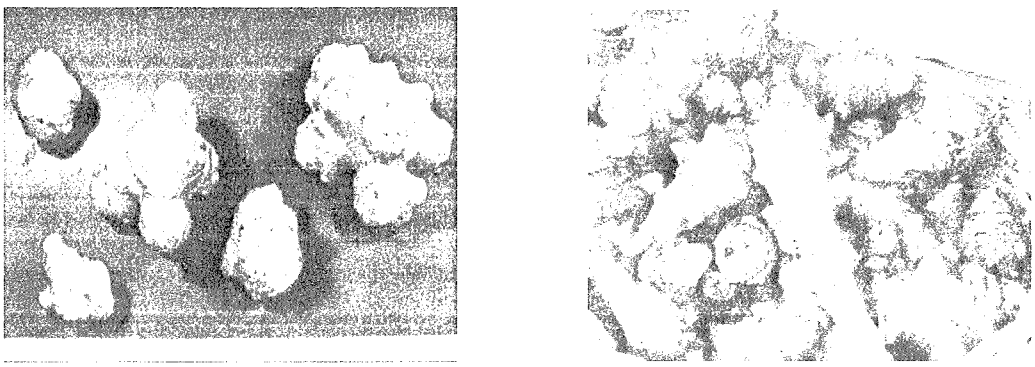
3.1 จุลินทรีย์และวัตถุดิบ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048 ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

แก่นตะวัน พันธุ์ KKU ACC 001 จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการวิจัยของ รองศาสตราจารย์ ดร. สนั่น จอกลอย โดยลักษณะของหัวแก่นตะวันที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของหัวแก่นตะวันพันธุ์ KKU ACC 001 ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YM (yeast extract malt extract) มีองค์ประกอบดังนี้

Yeast extract	3.0 กรัม
Malt extract	3.0 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Glucose	10.0 กรัม

เตรียมโดยการละลายส่วนผสมรวมกันในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้นผง (Agar) 20 กรัม ก่อนที่จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์

1) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-2501 ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2) พีเอชมิเตอร์ (pH-meter) รุ่น PHM 210 ของบริษัท Radiometer Cpenhegen ประเทศฝรั่งเศส

3) รีแฟคโตมิเตอร์ (Hand-Held refractometer) รุ่น N1 ของบริษัท ATAGO ประเทศเยอรมนี

4) ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) รุ่น Improved neubaver bright line ของบริษัท Boeco ประเทศเยอรมนี

5) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Sorvall RC 26 plus ของบริษัท Dupont ประเทศสหรัฐอเมริกา

6) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BP3100s ของบริษัท Satorius ประเทศเยอรมนี

7) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Control environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunwick Scientific Edison ประเทศสหรัฐอเมริกา

8) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น UM-65L VA ของบริษัท United Mechanical ประเทศไทย

9) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น SIGMA 1 K 15 ของบริษัท SIGMA Laboratory centrifuge ประเทศสหรัฐอเมริกา

10) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Incubator) รุ่น FOC 225 ของบริษัท VELP Scientific ประเทศอิตาลี

11) แก๊สโครมาโตรกราฟี (Gas chromatography, GC) รุ่น GC 14B ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น ประกอบด้วย

11.1 คอลัมน์ 20% PEG-20M ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น ความยาวคอลัมน์ 3 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.15 เซนติเมตร ขนาดวัสดุที่บรรจุ 60 เมส (mesh)

11.2 เครื่องประมวลผล C-R7 Ae plus Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12) เอชพีแอลซี (HPLC) ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น ประกอบด้วย

12.1 ปั๊ม LC-10 AD ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12.2 เครื่องฉีดตัวอย่างแบบ 6-port injector รุ่น 7725 ของบริษัท Rheodyn ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.3 ตัวตรวจวัด SPD-10A ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12.4 ตัวตรวจวัด RID-10A ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12.3 ตัวตรวจวัด RID-6A ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12.4 เครื่องประมวลผล C-R7 Ae plus Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

12.5 คอลัมน์ Aminex HPX-87H ขนาด 300x78 มิลลิลิตร ของบริษัท Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.6 คอลัมน์ Pinnacle II Amino (250 x 4.6 มิลลิลิตร) ของบริษัท Restek ประเทศสหรัฐอเมริกา ขนาดวัสดุที่บรรจุ 5 ไมโครเมตร

13) เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (Autopipette) ปริมาตร 20, 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Socorex Iesa S.A. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

14) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

15) ตู้ Laminar air flow รุ่น Europeene, R.D. ของบริษัท Flufrance

3.2.2 สารเคมี

สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางต่อไปนี้

ลำดับที่	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1	โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERK	เยอรมนี
2	เอนไซม์อินูลิเนส	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
3	อินูลิน	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
4	ฟีนอล	MERK	เยอรมนี
5	โซเดียมคาร์บอเนต	MERK	เยอรมนี
6	โปแตสเซียมเมทตะไบซัลไฟด์	MERK	เยอรมนี
7	โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	MERK	เยอรมนี
8	Sodium choride	MERK	เยอรมนี
9	Tataric acid	MERK	เยอรมนี

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วิธีเตรียมน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

นำหัวแก่นตะวันมาล้างทำความสะอาด แล้วนำไปบดด้วยเครื่องตีป่นจากนั้นนำไปบีบสกัดเอาเฉพาะส่วนน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันโดยใช้เครื่องบีบสกัดและส่วนน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่ได้รวบรวม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานต่อไป

3.3.2 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

3.3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

3.3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณของอินูลิน (Inulin)

วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด หรือน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric โดยใช้อินูลิน (Raftiline®GR) เป็นสารมาตรฐาน (Dubois et al.,1956)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยใช้ D(-)-Fructose (MW=180.16,Fluka) เป็นสารมาตรฐาน (Miller,1959)

จากนั้นหาปริมาณอินูลิน (Inulin content) โดยคำนวณจากปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดหรือน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) – ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar)

และคำนวณเปอร์เซ็นต์ (Inulin extraction yield (%)) โดยสมการ (Inulin content x Volume of extraction liquid / mass of artichoke powder) x 100

3.3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุบางชนิด

วัดปริมาณองค์ประกอบของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ ดังนี้ ไนโตรเจน (N), ฟอสฟอรัส (P), โพแทสเซียม (K), โซเดียม (Na), แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca), เหล็ก (Fe), แมงกานีส (Mn), คอปเปอร์ (Cu), สังกะสี (Zn), ซัลเฟอร์ (S) และคลอไรด์ (Cl) โดยใช้เครื่อง Atomic Absorption

3.3.3 วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์

เก็บรักษาเชื้อ *S. cerevisiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารแข็งใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.3.4 การเตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5048 เริ่มต้น (starter)

นำ *S. cerevisiae* จาก stock culture ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 โคโลนีไปเลี้ยงในอาหารสูตร yeast extract malt extract broth (YM broth) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงสู่อาหารใหม่ และบ่มที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ log phase

3.3.5 การศึกษาวิธีการเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้น (Pretreatment) ก่อนการหมัก

ศึกษาวิธีการเตรียมวัตถุดิบเริ่มต้น คือน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันจากแก่นตะวัน โดยมีวิธีการดังนี้

3.3.5.1 การย่อยวัตถุดิบด้วยกรด (Acid hydrolysis)

นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 3.3.1 มาวัดค่าของแข็งละลาย และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ค่าเท่ากับ 2.0 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเรียบร้อยแล้ว มาให้ความร้อนด้วยวิธีการต้ม เป็นเวลา 40 นาที โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เป็น 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ค่าเท่ากับ 5.0 ด้วยสารละลาย 5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แบ่งน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ได้นี้มาวัดหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด, น้ำตาลรีดิวซ์, ค่าของแข็งละลาย, ปริมาณอินูลิน, สารประกอบฟินอลิค, ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสที่เหลืออยู่ ส่วนของน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เหลือนี้จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดสอบการหมักในขั้นตอนต่อไป

3.3.5.2 การย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) และการศึกษาหาปริมาณเอนไซม์ Inulinase ที่ใช้เพื่อย่อยอินนูลิน

นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 3.3.1 มาวัดค่าของแข็งละลาย และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เตรียมไว้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Inulinase (Sigma-Aldrich, 17U/g) จาก *Aspergillus niger* โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เป็น 3, 8, 12, 16, 20, 40 และ 60 unit of enzyme ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ให้ความร้อนด้วยวิธีการต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น จากนั้นแบ่งน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่ได้นี้มาวัดหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และค่าของแข็งละลาย ส่วนของน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เหลือนี้จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดสอบการหมักในขั้นตอนต่อไป

3.3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้ *S. cerevisiae* ในระดับฟลาสก์ ด้วยวิธีการหมักแบบกะ

3.3.6.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

บรรจุน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแปรผันให้มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันเป็น 250, 300 และ 350 กรัมต่อลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ปิดฟลาสก์ด้วย air

lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (^{O}Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.3.6.2 การศึกษาความเข้มข้นของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

บรรจุน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่แปรผันให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกันเป็น 10^{6}, 10^{7} และ 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิดขวดด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (^{O}Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.3.6.3 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

บรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 400 มิลลิลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตรที่ได้จากข้อ 3.3.6.1 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 จากนั้นปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามปริมาณที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.6.2 ปิดฟลาสก์หมักด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (^{O}Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.3.6.4 การศึกษาความเข้มข้นของปริมาณไนโตรเจน

บรรจุน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันจากแก่นตะวันปริมาตร 400 มิลลิลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตรที่ได้จากข้อ 3.3.6.1 ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่ได้จากข้อ 3.3.6.3 ลงใน ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียไนเตรท ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และยูเรีย โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดเป็นกัน 0.25%, 0.5%, 0.75%, และ 1.0% จากนั้นปิดฟลาสก์ด้วยจุกสำลี และปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามปริมาณที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.2 ปิดฟลาสก์หมักด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.3.6.5 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อินนูลินเนสที่ใช้ย่อยน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 3.3.1 มาวัดค่าของแข็งละลาย และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ นำน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันแก่นตะวันที่เตรียมไว้มาย่อยด้วยเอนไซม์ Inulase (Sigma-Aldrich, 17U/g) จาก *Aspergillus niger* โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์เป็น 3, 8, 12, 16, 20, 40 และ 60 unit of enzyme ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ให้ความร้อนด้วยวิธีการต้ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นตามปริมาณที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.3.6.2 ปิดฟลาสก์หมักด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำ

กลั่นปลอดเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.3.6.6 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันโดยใช้ *S. cerevisiae* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักแบบกะ

โดยการนำสภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์จากข้อ 3.3.6.1 และ 3.3.6.5 มาผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาตรการทำงานเท่ากับ 4 ลิตร และกำหนดอัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ ระยะเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

- ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)
- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

3.4 การคำนวณ

วิธีคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ที่สำคัญของการผลิตเอทานอล แสดงดังต่อไปนี้

1) อัตราผลผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบกะ

$$\text{อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

2) ผลได้เอทานอล ($Y_{p/s}$)

$$\text{ผลได้เอทานอล } (Y_{p/s}) = \frac{\text{ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

3) ผลได้ของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี (Theoretical yield)

$$\text{ผลได้ของเอทานอลจากกระบวนการหมักเทียบกับทฤษฎี (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{Y_{p/s} \times 100}{0.51}$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของเอทานอล (กรัมของเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)

0.51 คือ ผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎีเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส