

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์การวิจัย
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยสามารถสรุปได้ดังตาราง

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV – 1601 UV – 2501	Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter)	PHM 210	Radiometer Copenhagen, France
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)	Hiclave HV – 85	Hirayama, Japan
4. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร (Fermenter)	Biostat – B	B. Braun Biotech International, Germany
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	G560E	Scientific industries, USA
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (Centrifuge)	Sorvall RC – 26 PLUS	Dupont, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (Microcentrifuge)	SIGMA 1 K 15	SIGMA Laboratory centrifuge, USA
8. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	PR 530 Delta Range	Mettler – Toledo, Germany
9. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)		Europeene, R.D. Flufrance
10. ตู้อบ (Hot air oven)	FD240	WTC Binder, Germany
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography)	GC 14B	Shimadzu, Japan
11.1 คอลัมน์	20% PEG-20M	Shimadzu, Japan
11.2 เครื่องประมวลผล	C-R7 Ae plus Chromatopac	Shimadzu, Japan

12. รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand-Held refractometer)	N-1	Atago
13. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	LC- 10 AD	Shimadzu, Japan

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่สำคัญสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังตาราง

ชื่อสารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. กรดซัลฟิวริก (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
3. กลูโคส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERK, Germany
5. ซูโครส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
6. ฟรุคโตส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
7. เอทานอล (เกรดสำหรับ GC หรือ HPLC)	MERK, Germany
8. ฟีนอลซัลฟิวริก	MERK, Germany
9. โซเดียมคาร์บอเนต	MERK, Germany
10. โปแตสเซียมเมทเตไบซัลไฟด์	MERK, Germany
11. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	MERK, Germany
12. yeast extract	BDH, England
13. malt extract	BDH, England
14. peptone	BDH, England

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารผที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์คืออาหารสูตร Yeast extract-Malt extract-medium (YM) ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังนี้

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

เตรียมโดยการละลายส่วนผสมรวมกันในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้นผง (agar) 20 กรัม ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ตั้งทิ้งไว้ในเย็น จึงนำไปใช้เลี้ยงยีสต์ต่อไป

3.4 วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์

ทำการเก็บรักษายีสต์ *S. cerevisiae* บนอาหารเอียงแข็ง (slant agar) สูตร YM โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารแข็งใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.5 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ มข. 40 ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต้นข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในการทดลองมีอายุประมาณ 120 วันหลังการปลูก ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวแล้วจะนำต้นข้าวฟ่างหวานไปบดสีกัดน้ำหวานโดยประยุกต์ใช้เครื่องหีบอ้อย จากนั้นเก็บรวบรวมน้ำหวานที่ได้มากรองเพื่อแยกตะกอนและสิ่งเจือปนต่างๆ ออก แบ่งน้ำหวานส่วนหนึ่งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่น ค่าความหวาน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ความเป็นกรดต่าง และปริมาณแร่ธาตุบางชนิด เช่น ไนโตรเจน แมกนีเซียม สังกะสี เหล็ก เป็นต้น สำหรับน้ำหวานส่วนที่เหลือนำไปเตรียมเป็นน้ำเชื่อมให้มีความหวานเริ่มต้นประมาณ 75 องศาบริกซ์ จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและผลิตเอทานอล

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงเลี้ยงในสูตรอาหาร YM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่ โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 1% โดยปริมาตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจนับด้วย haemocytometer นำเซลล์ที่ได้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3.7 วิธีการวิจัย

3.7.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่แปรผันระดับอุณหภูมิในการหมัก

บรรจุอาหารสูตรผลิตเอทานอลที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน (EP medium) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงไปโดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิดฟลากส์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที แปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงในช่วง 30-50 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol – sulphuric
- การเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยการนับเซลล์ด้วย haemocytometer
- ค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (Brix) ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography

จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล (ethanol yield) อัตราการผลิตเอทานอล (ethanol productivity) ในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

3.7.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่แปรผันความเป็นกรดต่างของอาหารเพาะเลี้ยง

ทำการปรับความเป็นกรดต่างของอาหารสูตร EP ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 4.0 - 6.0 จากนั้นบรรจุอาหารในปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงไป โดยกำหนดให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิดฟลากส์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72

ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1 รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

3.7.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่แปรผันปริมาณเซลล์ยีสต์ เริ่มต้น

บรรจุอาหารสูตร EP ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมแล้วตามผลการทดลองในข้อ 3.7.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฟลากส์ด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงไปโดยแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการปิดฟลากส์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1 รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

3.7.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่แปรผันปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น

เตรียมอาหารสูตร EP ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการแปรผันปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 200, 250 และ 300 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารให้เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 3.7.2 และบรรจุอาหารปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฟลากส์ด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 3.7.3 ทำการปิดฟลากส์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ตามที่กล่าวไว้ในข้อ 3.7.1 รวมทั้งวิเคราะห์

ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

3.7.5 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ภายใต้สภาวะที่แปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เตรียมอาหารสูตร EP ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน 3 แหล่งคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย ยีสต์สกัด และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดออกเป็น 0 - 1.00 กรัมต่อลิตร (สำหรับยีสต์สกัด ใช้ในความเข้มข้น 6, 9 และ 12 กรัมต่อลิตร) จากนั้นปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและค่าความเป็นกรดต่างของอาหารให้เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ก่อนหน้านี้ และบรรจุอาหารลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร ในปริมาตร 400 มิลลิลิตร จากนั้นปิด ฟลาสก์ด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงไปโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมตามผลการทดลองในข้อ 3.7.3 ทำการปิดฟลาสก์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ตามที่กล่าวแล้วในข้อ 3.7.1 รวมทั้งวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอลในแต่ละสภาวะของการเพาะเลี้ยง

ในการผลิตเอทานอลจากยีสต์ทนร้อนโดยการแปรผันปัจจัยต่างๆ ตามการทดลองในข้อ 3.7 นี้ จะทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 กับยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ซึ่งเป็นยีสต์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลและสุรากลั่น

3.8 การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหารสูตร EP ที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ความเป็นกรดต่าง และแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.7 จากนั้นเติมอาหารลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยให้มีปริมาตรในการหมัก (working volume) 1.5 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ

จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* DBKKUY-53 ลงไปโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม ทำการเพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ตามที่กล่าวแล้วในข้อ 3.7.1 รวมทั้งวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอล นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.9 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.9.1 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหยดบนกระจกของเครื่อง hand refractometer ที่ทำการปรับค่าแล้วด้วยน้ำกลั่น จากนั้นอ่านค่าความหวานที่ได้ และบันทึกข้อมูล

3.9.2 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric ตามวิธีการของ Taylor (1995) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์

3.9.3 การหาความเข้มข้นของเอทานอล

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC โดยใช้คอลัมน์ชนิด 20% PEG-20N ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเข้าคอลัมน์ 1 ไมโครลิตร ใช้แก๊สไนโตรเจนเหลวเป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) ควบคุมอุณหภูมิของอินเจกเตอร์ คอลัมน์และตัวตรวจจับ ที่ 180, 150 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ตัวตรวจจับแบบ TCD (thermal conductivity detector)

3.9.4 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Aminex HPX-87H เป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเข้าคอลัมน์ 10 ไมโครลิตร ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ เป็นวัฏภาค

ไหล (mobile phase) โดยใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ UV/RID (UV/refractive index detector)

3.9.5 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างไปหยดบนแผ่นสไลด์นับเซลล์ (haemocytometer) และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำแผ่นสไลด์นับเซลล์ไปวางใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจนับจำนวนเซลล์ในแต่ละช่อง และคำนวณจำนวนเซลล์ที่นับได้ต่อไป

3.9.6 การวัดค่า pH

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จากนั้นนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกค่า pH ที่ได้

3.9.7 การคำนวณประสิทธิภาพในการหมักเอทานอล

คำนวณประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปของผลได้เอทานอลและอัตราผลผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ผลได้ (Yield)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

$$\text{อัตราผลผลิต (Productivity)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปของความเข้มข้นของเอทานอล อัตราผลผลิตเอทานอล และผลได้ของเอทานอลที่อุณหภูมิต่างๆ

3.10 การวิเคราะห์ศักยภาพของข้าวฟ่างหวานในการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

ในการศึกษาศักยภาพของข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วนคือ 1) การประเมินผลผลิตของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกในฤดูต่างๆ 2) การศึกษาต้นทุนการผลิตข้าวฟ่างหวาน และ 3) การศึกษาต้นทุนการผลิตน้ำเชื่อมเข้มข้นจากข้าวฟ่างหวาน ซึ่งรายละเอียดวิธีการศึกษา สามารถสรุปได้ดังนี้

3.10.1 การประเมินผลผลิตของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกในฤดูต่างๆ

ทำการปลูกข้าวฟ่างหวานในแปลงทดสอบซึ่งประกอบด้วยแปลงทดสอบศูนย์วิจัย ข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา แปลงปลูกของเกษตรกร ต. จระเข้สามพัน อ.อุทอง จ.สุพรรณบุรี และแปลงปลูกของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หลังจากทำการไถพรวนดินและยกร่องปลูกแล้ว ทำการหยอดเมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่างหวานพันธุ์ มข.40 เป็นแถว โดยให้ระยะห่างระหว่างแถว 50 เซนติเมตร เมื่ออายุได้ 10 วัน ทำการถอนแยกให้ได้ระยะห่างระหว่างต้น 10 เซนติเมตร มีการกำจัดวัชพืช และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 เมื่อต้นข้าวฟ่างหวานมีอายุ 1 เดือน ในอัตรา 12.5 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับช่วงฤดูปลูกทำการทดสอบ 3 ช่วงคือ ต้นฤดูฝน (เดือนพฤษภาคม) กลางฤดูฝน (เดือนกรกฎาคม) และปลายฤดูฝน (เดือนกันยายน) ในการบันทึกผลจะบันทึกอายุดอกบาน 50 เปอร์เซ็นต์ ความสูง ขนาดลำต้น ความหวาน ผลผลิตเมล็ด และผลผลิตต้นสด

3.10.2 การศึกษาด้านทุนการผลิตข้าวฟ่างหวานของเกษตรกร

ในการศึกษาด้านทุนการผลิตข้าวฟ่างหวานของเกษตรกร ทำการศึกษาโดยการปลูกข้าวฟ่างหวานในแปลงปลูกของเกษตรกรบ้านดงธาตุ ต.ดงธาตุ อ.กุดจับ จ.อุดรธานี และบ้านหนองกง ต.ขอนยูง อ.กุดจับ จ.อุดรธานี ในพื้นที่รวม 200 ไร่ ทำการปลูกโดยใช้เครื่องปลูกโดยใช้ระยะห่าง 50x10 เซนติเมตร ทำการเตรียมดิน กำจัดวัชพืชและใส่ปุ๋ยเช่นเดียวกับการศึกษาผลผลิตของข้าวฟ่างหวานที่ปลูกในฤดูต่างๆ ตามที่กล่าวแล้วข้างต้น

3.10.3 การศึกษาด้านทุนในการผลิตน้ำเชื่อมเข้มข้นของโรงงาน

ในการศึกษาด้านทุนในการผลิตน้ำเชื่อมเข้มข้นของข้าวฟ่างหวาน จะทำการศึกษาโดยวิเคราะห์จากค่าใช้จ่ายทั้งหมดที่เกิดขึ้นตั้งแต่ค่าวัตถุดิบ ค่าขนส่ง การชั่งวัตถุดิบ การหีบน้ำตาล การเคี่ยวน้ำหวานให้เข้มข้น (มีความหวาน 75 องศาบริกซ์) รวมทั้งค่าไฟฟ้า ค่าจ้างแรงงานและค่าเสื่อมอุปกรณ์ เป็นต้น

3.10.4 การประเมินต้นทุนในการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน

ในการศึกษาด้านทุนในการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน จะทำการประเมินโดยคิดจากต้นทุนของค่าวัตถุดิบเท่านั้น ส่วนต้นทุนในการผลิตเอทานอลอันเกิดจากขั้นตอนการหมักและกลั่น จะใช้ข้อมูลอ้างอิงที่รายงานโดยสำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน (ต้นทุนในส่วนนี้โดยประมาณ 6.125 บาทต่อลิตร) ทั้งนี้การประเมินต้นทุนในการผลิตเอทานอลนั้น จะแบ่งการประเมินออกเป็น 2 ส่วน ตามลักษณะของวัตถุดิบที่ใช้คือ น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานสด และน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวาน