บทที่3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 จุลินทรีย์

Rhizopus oryzae MNT 006 , *Amylomyces rouxii* MNT 037 , *Aspergillus oryzae* MNT 029 และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ซึ่งเชื้อราและเชื้อยีสต์เหล่านี้แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย (วิมลลักษณ์, 2547) เก็บรักษาเชื้อโดยเชื้อราเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อยีสต์เลี้ยงบนอาหาร YM Agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ฮีมาไซโตมิเตอร์
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) ; JULABO
4. เตาอบไมโครเวฟ ; MITSUBISHI
5. ตู้เย็น
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
7. หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ; TOMY ES-315
8. ตู้อบความร้อน (Hot air oven) ; MEMMERT 600
9. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ; SHIMADZU 1601
10. เครื่องชั่ง ; METLER PG803
11. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ; ISSCO BVT123
12. เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Automatic Shaker) ; GALLENKAMP

3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (Scharlau)
2. แอมโมเนียมซัลเฟต (Scharlau)
3. แมกนีเซียมซัลเฟต (Scharlau)

4. ฟอสเฟตทาร์เทรต
5. คอปเปอร์ซัลเฟต
6. ทวีน 80
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์
8. โซเดียมซัลเฟต
9. กรดซัลฟูริค
10. กลูโคสแอนไฮดรัส
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต
12. แคลเซียมคลอไรด์
13. ยีสต์สกัด

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมแป้งมันเทศ

นำมันเทศมาล้างดินออกให้สะอาด หั่นเป็นแผ่นบางๆ ประมาณชิ้นละ 1 มิลลิเมตร นำไปเรียงบนถาดแสตนเลส แล้วนำเข้าอบที่ตู้อบ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จนกระทั่งชิ้นมันเทศแห้ง นำชิ้นมันเทศที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำมาร่อนผ่านตะแกรงขนาดรูตะแกรงเบอร์ 35 จะได้ผงแป้งมันเทศมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตรเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

3.2.2 การเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)

3.2.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

3.2.2.1.1 เตรียมโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตต ปริมาณ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.2.2.1.2 ปิเปตกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตรละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เมื่อต้องการเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ให้นำโซเดียมอะซิเตตที่เตรียมได้ ปริมาตร 35.2 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติกที่เตรียมได้ ปริมาตร 14.8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.0 โดยใช้ NaOH 1 โมลาร์ เป็นตัวปรับพีเอชของสารละลาย

3.2.2.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสปริมาณ 0.05 , 0.1 , 0.15 และ 0.20 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้หลอดฉีดยาพร้อมชุดกรอง Swinex ซึ่งการกรองเอนไซม์จะกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.2.3 การเตรียมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017

เขี่ยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสง(optical density ,OD) 0.5

3.2.4 ศึกษากระบวนการลิเคอแฟกชัน (Liquefaction) ของมันเทศ โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.2.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกระทั่งแป้งเริ่มมีความหนืดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในระหว่างการต้มต้องมีการคนแป้งมันเทศตลอดเวลาเพื่อป้องกันการไหม้ เมื่อครบเวลา นำลงจาก Hot plate stirrer และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.15 และ 0.20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเติมสารละลายเอนไซม์ฟลาสก์ละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Srichuwong, 2009) เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

จากการทดลองคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด มาใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.4.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการลิเคอแฟกชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปต้มบน Hot plate stirrer ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกระทั่งแป้งเริ่มมีความหนืดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในระหว่างการต้มต้องมีการคนแป้งมันเทศตลอดเวลาเพื่อป้องกันการไหม้ เมื่อครบเวลา นำลงจาก Hot plate stirrer และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.5.4.1 โดยแปรผันปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังนี้ 5,10,15 และ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.2.5 ศึกษากระบวนการแซคคาริฟิเคชัน (Saccharification) ของมันเทศโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส

3.2.5.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

เตรียมความเข้มข้นของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ดังนี้ ร้อยละ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 น้ำหนักโดยปริมาตร โดยการชั่งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาณ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้หลอดฉีดยาพร้อมชุดกรอง Swinex ซึ่งการกรองเอนไซม์จะกระทำในตู้ปลอดเชื้อ

3.2.5.2 ศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสม ต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสม มาย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ความเข้มข้นร้อยละ 0.005,0.010,0.015 และ 0.020 โดยเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Srichuwong, 2009) เมื่อครบกำหนดเวลานำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.2.5.3 ศึกษาปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมต่อกระบวนการแซคคาริฟิเคชัน

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสแล้ว มาย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.2 โดยเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลสปริมาตร 5,10,15 และ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson

3.2.6 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลแยกกับกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวข้างต้น นำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในขั้นต้น และปริมาณเอทานอลที่ได้โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี (Gas Chromatrography ; GC)

การทดลองนี้ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี Shimadzu 17A Chromatograph โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้ DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิลิตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ส่วนตัวตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง (Detector) คือชนิด Flame Ionization Detector (FID)

3.2.7 กระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)

นำแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วขั้นต้น นำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นและปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการศึกษาในขั้นต้น และเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลูกแป้ง โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะไร้อากาศ หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในขั้นต้น และปริมาณเอทานอลที่ได้โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทรกราฟี เปรียบเทียบผลการทดลองกับการหมักในหัวข้อ 3.2.6

3.2.8 คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันเทศให้เป็นน้ำตาลได้สูง

นำแป้งมันเทศ 6 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นจากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Somogyi Nelson (Nelson , 1944) คัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.9 ศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันเทศและระยะเวลาการย่อยแป้งเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด

แปรผันความเข้มข้นของแป้งมันเทศดังนี้ ร้อยละ 2 4 6 8 และ 10 น้ำหนักโดยปริมาตรโดยนำแป้งมันเทศ 2 4 6 8 และ 10 กรัมใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น ทำการเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกได้จาก 3.2.8 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง โดยเก็บน้ำหมักที่หมักได้ในแต่ละฟลาสก์ปริมาตร 10 มิลลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson คัดเลือกความเข้มข้นของแป้งมันเทศที่เหมาะสมต่อการหมักและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งมันเทศเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.10 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่ได้คัดเลือกไว้โดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated enzymatic Hydrolysis and Fermentation ,SHF) และกระบวนการย่อยกับการหมักเกิดขึ้นในขั้นตอนเดียวกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation , SSF)

3.2.10.1 กระบวนการ SHF (Separated Hydrolysis and Fermentation)

เตรียมความเข้มข้นของแป้งมันเทศที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.2.9 ปริมาณ 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมสารแขวนลอยสปอร์จากเชื้อราที่คัดเลือกได้จาก 3.2.4 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาหัวข้อ 3.2.9 เมื่อครบกำหนดเติมสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้

ร้อยละ 10 โดยปริมาตร หมักต่อเป็นเวลา 3 วัน ที่สภาวะเดิมเก็บปริมาตรน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง โดยนำน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง ที่ 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC)โดยทำการฉีดในสภาวะของก๊าซโครมาโตรกราฟฟี (GC17A Chromatograph shimadzu) ต่อกับเครื่องShimadu ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร โดยระบบจะทำงานที่อุณหภูมิจาก 60 องศาเซลเซียส ถึง 180 องศาเซลเซียส โดยใช้ฮีเลียมเป็นตัวพาและมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 30 kPa

3.2.10.2 กระบวนการ SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)

เตรียมความเข้มข้นของแป้งมันเทศที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.2.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกได้จาก 3.2.8 ลงไปปริมาตรร้อยละ10 และ เติมสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงไปพร้อมกัน นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันทำการเก็บปริมาตรของน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง โดยนำน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi Nelson และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักในกระบวนการ SHF และ SSF

3.2.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New Multiple Rang Test (DMRT) มีจำนวนซ้ำ 3 และใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ในการวิเคราะห์