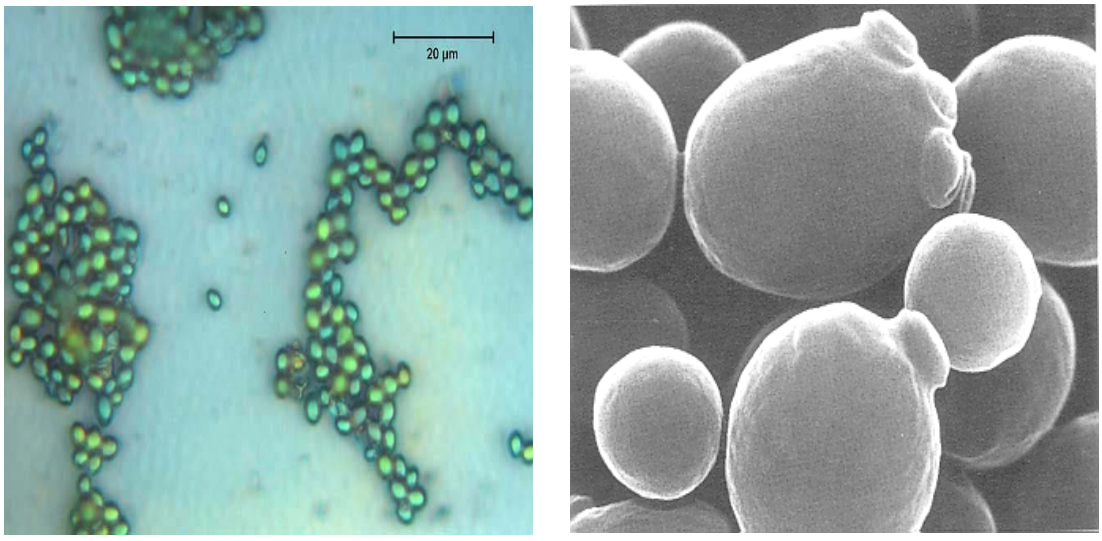
บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

ยีสต์(yeast)เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลเป็นอาหารเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ และในขณะเดียวกันทำให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเรียกว่ากระบวนการหมัก (fermentation) ขณะเดียวกันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีควบคู่กันไปด้วย ยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลนี้ ใช้ยีสต์สายพันธุ์ *S. erevisiae* ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมในการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และในอุตสาหกรรมอื่นๆ เพราะมีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะต่างๆได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นโดยเฉพาะอุณหภูมิที่มีค่าสูงๆ



ก.การอยู่เป็นกลุ่มของยีสต์ **ข.แสดงรูปร่างภายนอก**

ภาพที่ 3.1 แสดงยีสต์สายพันธุ์ *S. erevisiae*

3.1.2 วัสดุยึดเกาะ

แกลบที่บรรจุในลวดตาข่ายแล้วใช้ผ้าตาข่ายพลาสติกล้อมไว้อีกชั้น

ภาพที่ 3.2 แสดงการยึดตรึงแกลบไว้ในถังหมัก โดยการบรรจุใส่ในลวดตาข่าย

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.3.1. ถังหมัก (ท่อPVCและท่อใส) ถังเก็บสารละลายตั้งต้น (น้ำตาล) ถังเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล (ethanol)

ก.ถังหมักโดยใช้ท่อ PVC **ข.ถังหมักโดยใช้ท่อใส**

ภาพที่ 3.3 แสดงถังหมักและถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)

3.1.3.2. สายยางซิลิโคน

3.1.3.3. ปั๊ม Peristaltic 2 เครื่อง

ภาพที่ 3.4 แสดงปั๊ม Peristaltic อาศัยหลักการบีบทับของของเหลวในสายยางให้เกิดการไหล

3.1.3.4. Autoclave รุ่น VS-1221-100 ของบริษัท VISION SCIENCTIFIC

ภาพที่ 3.5 แสดงเครื่องAutoclave ที่ใช้ในกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อ

3.1.3.5. Peptone

3.1.3.6. น้ำตาล

3.1.3.7. Potassium metabisulphite (KMS)

3.1.3.8. Yeast Extract

3.1.3.9. KH_2PO_4

3.1.3.10. $(NH_4)_2SO_4$

3.1.3.11. $MgSO_4H_2O$

3.1.3.12. Sucrose (น้ำตาลทราย)

3.1.3.13. Glucose

3.1.3.14. Dextrose

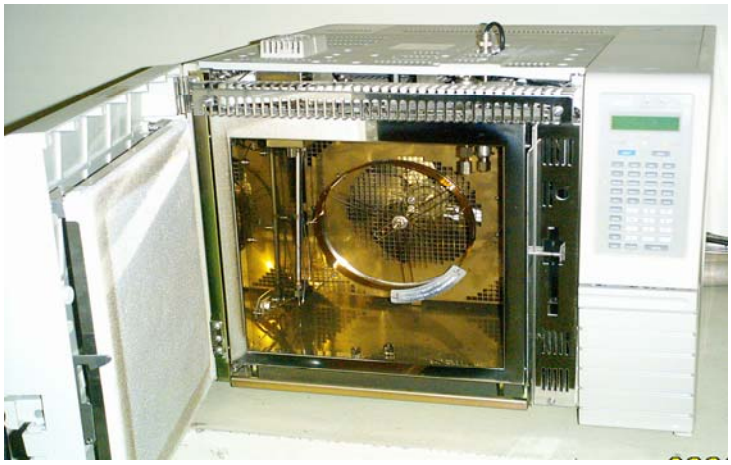
3.1.3.15. น้ำกลั่น

3.1.4 เครื่องมือวิเคราะห์

3.1.4.1. Spectrophotometer Pharmacia Biotech ใช้วัดหาน้ำตาล

ภาพที่ 3.6 แสดงเครื่องSpectrophotometer Pharmacia Biotech

3.1.4.2.Gas chromatography(GC) รุ่นGC-174 ยี่ห้อSHIMADZU ใช้วัดหาเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล



ภาพที่ 3. 7 แสดงเครื่องGas chromatography (GC)

3.2 วิธีการทดลองเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ในการออกแบบถังหมัก

3.2.1 การทดลองที่ 1 หาคุณลักษณะการทำงานของปั๊ม

เนื่องจากปั๊มที่จะนำมาใช้ในการทดลอง มีสเกลบอกมาเป็นค่ารอบต่อนาที (rpm) ซึ่งจะเห็นว่าไม่สอดคล้องในทางปฏิบัติ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ของอัตราการไหลระหว่างหน่วยรอบต่อนาที (rpm) กับหน่วยมิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) แล้วนำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้สายยางเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 3 มิลลิเมตร

ภาพที่ 3.8 แสดงการทดลองหาคุณสมบัติการทำงานของปั๊ม

3.2.1.1 จุดประสงค์

เพื่อให้ทราบอัตราการไหลจริงที่จะนำไปใช้ในหน่วยมิลลิลิตรต่อนาที

3.2.1.2 วิธีการทดลอง

3.2.1.2.1 เปิดปั๊ม แล้วเลือกอัตราการไหลที่ปั๊มในสเกลรอบต่อนาที ได้แก่ 2, 5, 10,15, 20, 25, 30 และ 35 รอบต่อนาที

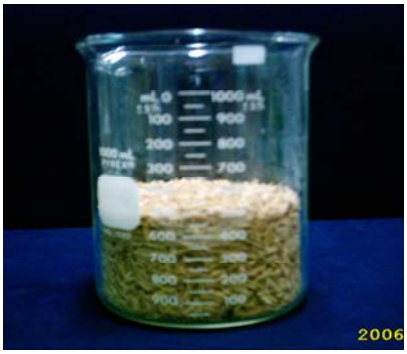
3.2.1.2.2 จับเวลาในการไหลของปั๊มสเกลละ 90 วินาที

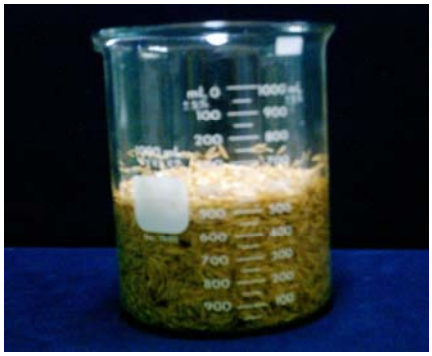
3.2.1.2.3 วัดปริมาตรของน้ำที่ได้จากแต่ละสเกล

3.2.1.2.4 บันทึกผลการทดลองและนำมาเขียนกราฟอัตราการไหลโดยให้แกนนอนคือสเกลรอบต่อนาที (rpm) และแกนตั้งเป็นสเกลมิลลิลิตรต่อนาที(ml/min)

3.2.2 การทดลองที่ 2 การหาปริมาตรร้อยละของน้ำต่อปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ

การหาปริมาตรของน้ำหมักเมื่อทำการบรรจุแกลบลงไปในถังหมัก เป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากปริมาตรน้ำที่แท้จริงโดยไม่คิดปริมาตรของแกลบ จะนำไปใช้ในการคำนวณอัตราการไหลของน้ำหมักที่เหมาะสม แต่เนื่องจากถังหมักมีขนาดใหญ่ไม่เหมาะกับการวัดหาปริมาตรน้ำโดยตรง จึงทำการจำลองการหาปริมาตรเป็นสเกลที่มีขนาดเล็กลง เพื่อนำไปเทียบอัตราส่วนกับถังหมักจริง ซึ่งจะเป็นวิธีที่ง่ายสะดวกและรวดเร็ว





ก.ก่อนเติมน้ำ **ข.หลังเติมน้ำ**

ภาพที่ 3.9 แสดงการทดลองหาปริมาตรร้อยละของน้ำต่อปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ

3.2.2.1 จุดประสงค์

เพื่อทำการหาปริมาตรร้อยละของน้ำต่อปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ

3.2.2.2 วิธีการทดลอง

3.2.2.2.1 เทแกลบลงบีกเกอร์ ให้มีปริมาตรที่ 600 , 800 , 1,000 มิลลิลิตร

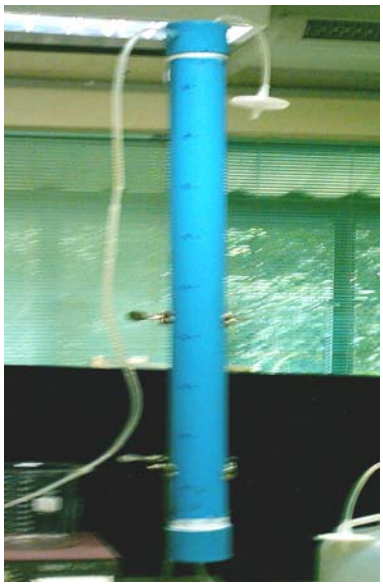
3.2.2.2.2 เทน้ำลงไปโดยไม่ทำให้ระดับแกลบในบีกเกอร์เดิมเปลี่ยนแปลง

3.2.2.2.3 เทน้ำออกและวัดปริมาตรน้ำที่เทลงในบีกเกอร์แต่ละปริมาตร

3.2.2.2.4 ทำการบันทึกผลการทดลองที่ได้และนำไปหาปริมาตรจริง

3.2.3 การทดลองที่ 3 หาอัตราการไหลเข้าเทียบอัตราการไหลออกในถังหมักของน้ำหมัก

ในการทดลองหมักเอทานอล เนื่องจากในต้นแบบถังหมักที่ 1 ถังหมักที่ใช้เป็นท่อทึบ(ท่อPVC) ทำให้ไม่สามารถมองเห็นระดับน้ำภายในถังหมักได้และไม่ทราบว่าอัตราการไหลของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ที่เข้าไปในถังหมักจะเท่ากับอัตราการไหลของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักหรือไม่ เพราะหากอัตราการไหลของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)ที่ทางเข้ามากกว่าอัตราการไหลของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ทางออก น้ำหมักก็จะเกิดการไหลออกไปยังช่องระบายอากาศที่อยู่ด้านบนของถังหมัก ดังรูปข้างล่าง (รูป ข.)



ก.ถังที่ใช้ท่อPVC **ข.แสดงช่องระบายอากาศ**

ภาพที่ 3.10 แสดงลักษณะถังที่ใช้ท่อทึบ(ท่อPVC) ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.3.1 จุดประสงค์

เพื่อต้องการให้ทราบว่าอัตราการไหลของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)ที่ทางเข้าของถังหมักจะเท่ากับอัตราการไหลของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักที่ทางออกของถังหมักหรือไม่

3.2.3.2 วิธีการทดลอง

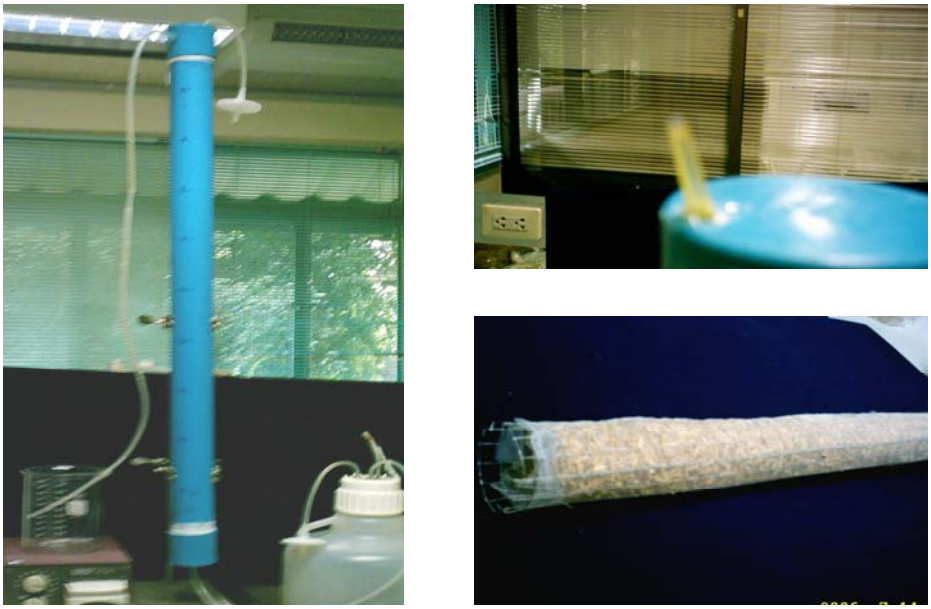
3.2.3.2.1 เปิดปั๊ม ให้น้ำไหลเข้าไปภายในถังหมักที่ทางเข้าด้วยอัตราการไหลต่างๆ ดังนี้ 10, 20, 30 และ 40 มิลลิลิตรต่อนาที

3.2.3.2.2 วัดปริมาตรน้ำที่ไหลออกมา ภายในเวลา 90 วินาที แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ที่อัตราการไหลต่างๆ

3.2.3.2.3 บันทึกผลการทดลองที่ได้แล้วนำมาวิเคราะห์

ภาพที่ 3.11 แสดงการทดลองหาอัตราการไหลเข้าเทียบอัตราการไหลออกของน้ำหมัก

3.3 สร้างต้นแบบถังหมักที่ 1



ภาพที่ 3.12 แสดงรูปของต้นแบบถังหมักที่ 1และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 ขนาดของต้นแบบถังหมักที่ 1

3.3.1.1 เส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักขนาด 2 นิ้ว (5.08 เซนติเมตร)

3.3.1.2 ถังหมักมีความยาว 1 เมตร

3.3.1.3 ปริมาตรของถังหมัก 2,026 มิลลิลิตร

3.3.2 ประโยชน์ที่ได้รับจากต้นแบบถังหมักที่ 1

เนื่องจากการทำโครงการนี้เป็นเรื่องที่ใหม่และยังไม่เคยศึกษามาก่อนจึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวข้อง พร้อมทั้งเพิ่มประสบการณ์ในทางปฏิบัติให้มาก จึงได้ทำการออกแบบและสร้างถังหมักที่ 1 ออกมา โดยในต้นแบบถังหมักที่ 1 เป็นถังหมักที่ใช้จำลองและทดสอบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จะใช้ในการฝึกทักษะเกี่ยวกับกระบวนการหมักเอทานอลทุกขั้นตอน เช่น การเลี้ยงเชื้อยีสต์ การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ การทำให้อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักปลอดเชื้อ รวมทั้งการตรึงเซลล์ ในขั้นตอนกระบวนการหมัก และศึกษาข้อบกพร่องต่างๆจากต้นแบบถังหมักที่ 1 จะถูกนำไปใช้เป็นเงื่อนไขในการออกแบบต้นแบบถังหมักที่ 2 ต่อไป

3.4 วิธีการทดลองกระบวนการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 1 (ท่อPVC)

เพื่อจำลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องอย่างคร่าวๆ และฝึกทักษะเพื่อเพิ่มประสบการณ์ในการทดลองให้มากขึ้น จึงทำการออกแบบและสร้างต้นแบบถังหมักที่ 1 ขึ้น โดยการใช้วัสดุที่หาง่าย และประหยัดคือใช้ท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว(5.08 เซนติเมตร) ยาว 100 เซนติเมตร มีปริมาตรความจุภายในถังหมัก 2026 มิลลิลิตร(2 .026 ลิตร) แล้วนำผ้าตาข่ายพลาสติกมาเย็บเข้ากับลวดตาข่ายที่ดัดเป็นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักประมาณ 0.10 - 0.50 เซนติเมตร เพื่อให้สามารถใส่เข้าไปยังภายในถังหมักได้ จากนั้นมีขั้นตอนวิธีการทดลองกระบวนการหมักในถังหมักต้นแบบที่ 1 ดังนี้

3.4.1. นำแกลบมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 lb/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อแกลบแห้งแล้วนำมาบรรจุใส่ภายในลวดตาข่ายที่เตรียมไว้ให้เต็มความจุ ดังภาพข้างล่าง

ภาพที่ 3.13 แสดงรูปลวดตาข่ายที่ใช้ผ้าตาข่ายพลาสติกเย็บล้อมอีกที

3.4.2. นำแกลบที่บรรจุในลวดตาข่าย มายัดใส่ลงไปในถังหมักต้นแบบที่ 1 แล้วเตรียมสารละลาย KMS ที่ความเข้มข้น 200 ppm. เพื่อทำกรรมวิธีฆ่าเชื้อในถังหมัก นำไปใส่ถังหมักทิ้งไว้ 1 คืนแล้วปล่อยน้ำทิ้ง สารละลาย KMS นี้จะใช้เวลาในการสลายตัว 10 -12 ชั่วโมง

3.4.3. เตรียมสารละลายตั้งต้น (น้ำตาล)ที่จะใช้เป็นอาหารในกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งมีสูตรสารเคมีในน้ำ 1000 มิลลิลิตร(1 ลิตร) ดังนี้

3.4.3.1 Yeast Extract	10 g.
3.4.3.2 Peptone	20 g.
3.4.3.3 Dextrose	20 g.

เนื่องจากถังหมักจุได้ 2.026 ลิตร และยังไม่คิดปริมาตรแกลบ (ร้อยละ 15 ของปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ)ที่ต้องหักออกด้วย จึงเตรียมสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) จำนวนทั้งหมด 3 ลิตร (สำรองไว้ 1 ลิตร)

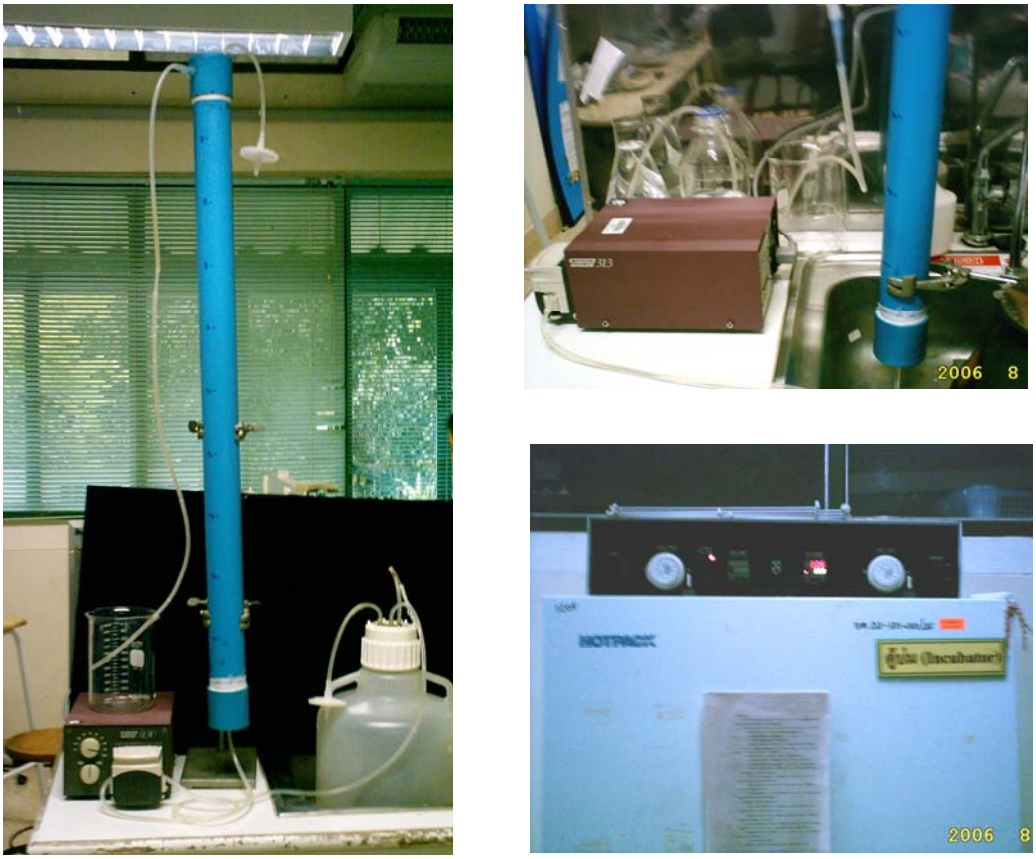
ภาพที่ 3.14 แสดง การเตรียมสารละลายตั้งต้น (น้ำตาล)

3.4.4. นำสารละลายตั้งต้นที่เตรียมเสร็จแล้ว บรรจุลงในถังเก็บสารละลายตั้งต้น จากนั้นทำกรรมวิธีให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 lb/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที รวมถังเปล่าที่ใช้เก็บสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักด้วย

3.4.5. ทิ้งถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ให้เย็นลง 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ ที่เตรียมไว้ มาเติมลงไปในถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)

3.4.6. นำต้นแบบถังหมักที่ 1 เข้าไปทำกระบวนการหมักในตู้บ่ม เพื่อรักษาอุณหภูมิระหว่างเกิดกระบวนการหมักให้คงที่ อยู่ที่ 40 °C แล้วทำการเปิดปั๊มที่อัตราการไหล 3.92 ml/min เพื่อให้สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ไหลเข้าไปภายในถังหมักต้นแบบที่ 1 จนเต็ม ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักแบบ Batch ก่อน

สำหรับการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรึงแกลบร่วมในถังหมักต้นแบบที่ 1 นี้ เป็นการทดลองแบบเต็มรูปแบบและอาศัยความต่อเนื่องในการเตรียมการแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาตั้งแต่การเตรียม แกลบ ถังหมัก เตรียมสารละลายตั้งต้น กรรมวิธีทำให้ปลอดเชื้อ จนถึงขั้นตอนกระบวนการตรึงเซลล์ ใช้เวลาทั้งสิ้น 6 วัน ซึ่งต้องอาศัยความเพียรพยายามและความเอาใจใส่เป็นอย่างสูง เพื่อให้ทุกขั้นตอนเป็นไปอย่างต่อเนื่องและถูกต้อง



ภาพที่ 3.15 แสดงการทดลองกระบวนการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 1 (ท่อPVC)

3.5 การออกแบบต้นแบบถังหมักที่ 2

จากผลการทดลองที่ได้จากการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรึงแกลบร่วมในต้นแบบถังหมักที่ 1 ได้เงื่อนไขที่ใช้ในการออกแบบต้นแบบถังหมักที่ 2

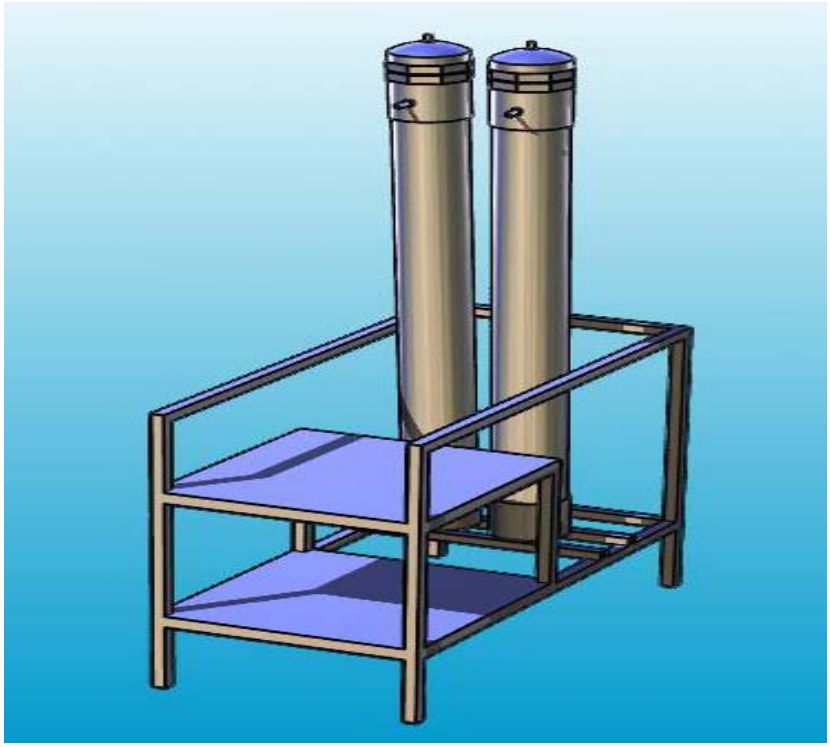
3.5.1. สร้างโครงเหล็กเพื่อใช้ยึดตัวถังหมักให้อยู่ในแนวตั้ง และโครงยึดต้องมีขนาดไม่ใหญ่เกินตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีขนาด 45 x77 x 150 เซนติเมตร

3.5.2. ถังหมักควรมีมากกว่า 1 ถัง เนื่องจากแต่ละขั้นตอนกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้ได้มาซึ่งกระบวนการหมักนั้น ต้องใช้เวลาในการดำเนินการอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานาน

3.5.3. ท่อทางน้ำออกของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้ต้องมีขนาดใหญ่กว่าท่อทางเข้าของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) เพื่อทำให้ลดแรงเสียดทานของการไหลและลดการอุดตันของแกลบซึ่งจะไม่ก่อให้เกิด น้ำล้นออกที่ช่องระบายอากาศ

3.5.4. ขนาดของถังเก็บบรรจุสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)และสารละลายผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักเอทานอลต้องมีขนาดเล็กลง เนื่องจากพื้นที่มีขนาดจำกัด

จากเงื่อนไขที่กล่าวมานี้ทำให้สามารถนำไปใช้ในการออกแบบต้นแบบถังหมักที่ 2 ดังรูป



ภาพที่ 3.16 แสดงแบบของต้นแบบถังหมักที่ 2

3.6 สร้างต้นแบบของถังหมักที่ 2

จากการออกแบบโดยใช้เงื่อนไขเบื้องต้น จึงได้ทำการสร้างต้นแบบของถังหมักที่ 2 ซึ่งมีขั้นตอนในการสร้าง ดังต่อไปนี้

3.6.1. สร้างโครงเหล็กเพื่อใช้ในการยึดถังหมักจำนวน 2 ถัง และมีพื้นที่ในการวางปั๊มกับถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)และสารละลายผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักเอทานอล โดยใช้เหล็กกล่องที่มีขนาดหน้าตัด 2 x 2 เซนติเมตร

3.6.2. สร้างถังหมักโดยใช้ท่อใสเพื่อทำให้สามารถมองเห็นกระบวนการการปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดภายในถังหมัก โดยท่อใสนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว (10.16 เซนติเมตร) ยาว 100 เซนติเมตร(1 เมตร) จำนวน 2 ถัง

3.6.3. เจาะรูเพื่อทำเป็นช่องทางการไหลเข้าของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)และช่องทางการไหลออกของสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล รวมทั้งช่องระบายอากาศทางด้านบนสุดของถังหมัก

3.6.4. ประกอบโครงยึดและต้นแบบถังหมักที่ 2 เข้าด้วยกัน

ภาพที่ 3.17 แสดงต้นแบบถังหมักที่ 2

3.7 วิธีการหาค่า Retention Time (RT) และ Dilution rate ในต้นแบบถังหมักที่ 2

ในการทดลองจำเป็นที่ต้องหาค่า Retention Time (RT) เพื่อให้ทราบระยะเวลาที่สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) จะไหลเข้าไปเต็มถังหมักนั้นใช้เวลาเท่าไร เพื่อที่จะเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องและทำการปรับเปลี่ยนค่าอัตราการไหลอื่นๆ เพื่อหาค่า Retention Time (RT) ที่อัตราการไหลนั้นๆ แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า Retention Time (RT) ที่เหมาะสมและหาอัตราการเจือจาง (Dilution rate) เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะกับปริมาตรของภาชนะที่ให้ผลิตภัณฑ์(เอทานอล)ที่ต้องการออกมามากที่สุด

3.7.1 จุดประสงค์

หาค่า Retention Time (RT) และอัตราการเจือจาง(Dilution rate)

3.7.2 วิธีการทดลอง

3.7.2.1 เติมน้ำให้เต็มถังหมักที่มีแกลบ แล้วปล่อยน้ำออกจากถังหมักเพื่อวัดหาปริมาตรน้ำที่ถังหมักสามารถจุได้ทั้งหมด

3.7.2.2 เปิดปั๊ม ให้น้ำไหลเข้าไปในต้นแบบถังหมักที่ 2 ที่อัตราการไหล 2 rpm แล้วนำบีกเกอร์มารองน้ำที่ไหลออกมาจากช่องทางออกของถังหมัก พร้อมจับเวลาที่ 20 นาที

3.7.2.3 นำน้ำจากบีกเกอร์ ที่ได้จากการไหลทางช่องออกของถังหมักมาตวงเพื่อวัดหาปริมาตรน้ำที่ไหลออกมา แล้วจดบันทึกลงในตารางผลการทดลอง

3.7.2.4 ทำการทดลองโดยการเปลี่ยนอัตราการไหล เป็น 4 rpm, 6 rpm และ 8 rpm ที่ปั๊มแล้วทำการจับเวลาที่อัตราการไหลต่างๆ อย่างละ 2 รอบ

3.7.2.5 นำผลการทดลองที่ได้ไปคำนวณหาค่า Retention Time (RT) และค่า Dilution rate ที่อัตราการไหลต่างๆ ต่อไป

ภาพที่ 3.18 แสดงการทดลองหาค่า Retention Time (RT) และค่า Dilution rate

3.8 วิธีการทดลองการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 2 (ท่อใส) ครั้งที่ 1 ใช้สูตรอาหาร YPD

ในการทดลองนี้ จะทำการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้สูตรอาหาร YPDมาเป็นสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) โดยในกระบวนการหมักจะทำการหมักแบบ Batch ก่อน 2 วันในตู้บ่มเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วหลังจากนั้นจะทำการเปิดปั๊มให้สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ไหลเข้าไปอย่างต่อเนื่อง พร้อมทั้งปรับเปลี่ยนค่าอัตราการไหลที่ความเร็วรอบต่างๆต่อนาที เพื่อศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งมีวิธีขั้นตอนดำเนินงานดังนี้

3.8.1 นำแกลบมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 p/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อแกลบแห้งแล้วนำมาบรรจุใส่ต้นแบบถังหมักที่ 2 ที่เตรียมไว้ให้เต็มความจุที่กำหนดไว้

3.8.2 เย็บผ้าตาข่ายพลาสติกไว้กับลวดตาข่ายเพื่อใช้กั้นแกลบเฉพาะที่ช่องทางไหลเข้าของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)และช่องทางไหลออกของสารละลายผลิตภัณฑ์ภายในถังหมัก

3.8.3 ใส่แกลบลงไปในถังหมักแล้วนำลวดตาข่ายที่เตรียมไว้มาใส่ทั้ง 2 ด้าน แล้วเตรียมสารละลาย KMS ที่ความเข้มข้น 200 ppm. เพื่อทำกรรมวิธีฆ่าเชื้อในถังหมัก นำไปใส่ถังหมักทิ้งไว้ 1 คืนแล้วปล่อยน้ำทิ้ง

3.8.4 เตรียมสูตรอาหารของสารตั้งต้น YPD (Yeast extract sucrose medium) ซึ่งมีสูตรสารเคมีในน้ำ 1000 มิลลิลิตร(1 ลิตร) ดังนี้

3.8.4.1 Yeast Extract	10 g.
3.8.4.2 Peptone	20 g.
3.8.4.3 Glucose	20 g.

เนื่องจากถังหมักจุปริมาตรทั้งหมดในถังหมักได้ 8,103 มิลลิลิตร (8.10 ลิตร) โดยมีปริมาตรน้ำอยู่ร้อยละ 85 ของปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ ดังนั้นสามารถบรรจุน้ำได้ (8,103) X (0. 85) = 6,887.55 มิลลิลิตร จึงต้องเตรียมสารละลายตั้งต้นทั้งหมด 15 ลิตร (สำรองไว้ 1 ลิตร) สำหรับถังหมัก 2 ถัง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) อีกวันละ 15 ลิตร เพื่อใช้ในการ feed เข้าไปในถังหมักเพื่อไล่น้ำหมักในกระบวนการหมักแบบ Batch ออก

3.8.5 นำสารละลายตั้งต้นที่เตรียมเสร็จแล้ว บรรจุลงในถังเก็บสารละลายตั้งต้น จากนั้นทำกรรมวิธีให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 p/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที รวมทั้งถังเปล่าที่ใช้เก็บสารละลายผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักด้วย

3.8.6 ทิ้งถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ให้เย็นลง 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ ที่เตรียมไว้ มาเติมลงไปในถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)

3.8.7 นำต้นแบบถังหมักที่ 2 เข้าไปทำกระบวนการหมักในตู้บ่มทั้ง 2 ถัง เพื่อรักษาอุณหภูมิระหว่างเกิดกระบวนการหมักให้คงที่ อยู่ที่ 40 °C แล้วทำการเปิดปั๊มที่อัตราการไหล 2 rpm เพื่อให้สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ไหลเข้าไปภายในถังหมักต้นแบบที่ 2 จนเต็ม ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดกระบวนการหมักแบบ Batch ก่อน จากนั้นก็เริ่มจับเวลาเพื่อทำการปรับอัตราการไหล เป็น 4 rpm, 6 rpm ตามลำดับ ที่ Retention Time (RT) และอัตราการเจือจาง(Dilution rate) ต่างๆที่ได้จากการคำนวณในการทดลองที่ผ่านมา

3.8.8 เมื่อเก็บตัวอย่างหมดแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและเอทานอลต่อไป

ภาพที่ 3.19แสดงกระบวนการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 2 (ท่อใส) ครั้งที่ 1

ในการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรึงแกลบร่วมนี้ในต้นแบบถังหมักที่ 2 ทั้ง 2 ถัง ใช้สูตรอาหารคือ YPD (Yeast extract sucrose medium) ซึ่งค่าดำเนินการเฉพาะสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ค่อนข้างสูง และใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานทุกขั้นตอนตั้งแต่ขั้นเตรียมการจนถึงการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลใช้เวลาทั้งสิ้น 10 วัน

3.9 วิธีการทดลองการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 2 (ท่อใส) ครั้งที่ 2 ใช้สูตรอาหาร YSM

ในการทดลองนี้ จะทำการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างจากเดิมคือYPD (Yeast extract sucrose medium) มาใช้สาร YSM (Yeast sucrose medium) เป็นสารละลายตั้งต้น (น้ำตาล) เพื่อลดต้นทุนสารเคมีที่นำมาใช้เป็นสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ในกระบวนการหมักจะทำการหมักแบบ Batch ก่อน 2 วันในตู้บ่มเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วหลังจากนั้นจะทำการเปิดปั๊มให้สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ไหลเข้าไปอย่างต่อเนื่อง พร้อมทั้งปรับเปลี่ยนค่าอัตราการไหลที่ความเร็วรอบต่างๆต่อนาที เพื่อศึกษาหาอัตราการไหลที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งมีวิธีขั้นตอนดำเนินงานเหมือนกับการทดลองครั้งที่ 1 ดังนี้

3.9.1 นำแกลบมาล้างให้สะอาด แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 p/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อแกลบแห้งแล้วนำมาบรรจุใส่ต้นแบบถังหมักที่ 2 ที่เตรียมไว้ให้เต็มความจุที่กำหนดไว้

3.9.2 เย็บผ้าตาข่ายพลาสติกไว้กับลวดตาข่ายเพื่อใช้กั้นแกลบเฉพาะที่ช่องทางไหลเข้าของสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)และช่องทางไหลออกของสารละลายผลิตภัณฑ์ภายในถังหมัก

3.9.3 ใส่แกลบลงไปในถังหมักแล้วนำลวดตาข่ายที่เตรียมไว้มาใส่ทั้ง 2 ด้าน แล้วเตรียมสารละลาย KMS ที่ความเข้มข้น 200 ppm. เพื่อทำกรรมวิธีฆ่าเชื้อในถังหมัก นำไปใส่ถังหมักทิ้งไว้ 1 คืนแล้วปล่อยน้ำทิ้ง

3.9.4 เตรียมสูตรอาหารของสารตั้งต้น สาร YSM (Yeast sucrose medium) ซึ่งมีสูตรสารเคมีในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร(1 ลิตร) ดังนี้

3.9.4.1 Yeast Extract	6 g.
3.9.4.2 Peptone	5 g.
3.9.4.3 Sucrose (น้ำตาลทราย)	120 g.
3.9.4.4 KH_2PO_4	4 g.
3.9.4.5 $(NH_4)_2SO_4$	2 g.
3.9.4.6 $MgSO_4H_2O$	1 g.

เนื่องจากถังหมักจุปริมาตรทั้งหมดในถังหมักได้ 8,103 มิลลิลิตร (8.10 ลิตร) โดยมีปริมาตรน้ำอยู่ร้อยละ 85 ของปริมาตรแกลบรวมกับน้ำ ดังนั้นสามารถบรรจุน้ำได้ (8,103) X (0. 85) = 6,887.55 มิลลิลิตร จึงต้องเตรียมสารละลายตั้งต้นทั้งหมด 15 ลิตร (สำรองไว้ 1 ลิตร) สำหรับถังหมัก 2 ถัง หลังจากนั้นเตรียมสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) อีกวันละ 15 ลิตร เพื่อใช้ในการ feed เข้าไปในถังหมักเพื่อไล่น้ำหมักในกระบวนการตรึงเซลล์ออก

3.9.5 นำสารละลายตั้งต้นที่เตรียมเสร็จแล้ว บรรจุลงในถังเก็บสารละลายตั้งต้น จากนั้นทำกรรมวิธีให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่เครื่อง Autoclave ที่ความดัน 15 lb/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที รวมทั้งถังเปล่าที่ใช้เก็บสารละลายผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักด้วย

3.9.6 ทิ้งถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ให้เย็นลง 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ ที่เตรียมไว้ มาเติมลงไปในถังเก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล)

3.9.7 นำต้นแบบถังหมักที่ 2 เข้าไปทำกระบวนการหมักในตู้บ่มทั้ง 2 ถัง เพื่อรักษาอุณหภูมิระหว่างเกิดกระบวนการหมักให้คงที่ อยู่ที่ 40 °C แล้วทำการเปิดปั๊มที่อัตราการไหล 3.92 ml/min เพื่อให้สารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ไหลเข้าไปภายในถังหมักต้นแบบที่ 2 จนเต็ม ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักแบบ Batch ก่อน จากนั้นก็เริ่มจับเวลาเพื่อทำการปรับอัตราการไหลเป็น 6.6 ml/min, 9.47 ml/min ตามลำดับ ที่ Retention Time (RT) และอัตราการเจือจาง(Dilution rate) ต่างๆที่ได้จากการคำนวณในการทดลองที่ผ่านมา

3.9.8 เมื่อเก็บตัวอย่างหมดแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและเอทานอลต่อไป

ภาพที่ 3.20 แสดงกระบวนการหมักในต้นแบบถังหมักที่ 2 (ท่อใส) ครั้งที่ 2

ในการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรึงแกลบร่วมนี้ในต้นแบบถังหมักที่ 2 ทั้ง 2 ถัง ใช้สูตรอาหารคือ สาร YSM (Yeast sucrose medium) ซึ่งเดิมค่าดำเนินการเฉพาะสารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งที่ 1 นั้นค่อนข้างสูงจึงทำการปรับเปลี่ยนมาใช้สูตรอาหารที่ต้นทุนไม่สูงมากนักโดยได้นำน้ำตาลทรายมาใช้เป็นสูตรอาหารในการเตรียมสารละลายตั้งต้น(น้ำตาล) ใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานทุกขั้นตอนตั้งแต่ขั้นเตรียมการจนถึงการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลใช้เวลาทั้งสิ้น 12 วัน