

อุปกรณ์ วัสดุ และการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และวัสดุ

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญ ได้แก่ เครื่องพาสเจอร์ไรซ์ ระบบหมักเอทานอล และระบบหมักน้ำส้มสายชู โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 เครื่องพาสเจอร์ไรซ์

ระบบพาสเจอร์ไรซ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อฆ่าทำลายจุลินทรีย์ในน้ำส้มเปรรด เพื่อไม่ให้ก่อปัญหาในขั้นตอนการหมัก เครื่องพาสเจอร์ไรซ์ประกอบด้วยถังเก็บน้ำส้มเปรรดก่อนที่จะผ่านการให้ความร้อน เป็นถังสแตนเลสทรงกระบอกมีฝาปิด ความจุประมาณ 30 ลิตร ทางด้านล่างของถังเก็บต่อเข้ากับท่อสแตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 ซม. ขดเป็นวงกลมหลาย ๆ ชั้น ให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ซม. บรรจุอยู่ภายในถังสแตนเลสทรงกระบอกซึ่งบรรจุน้ำมัน และมีขดลวดให้ความร้อนอยู่ภายในถัง

หลักการพาสเจอร์ไรซ์ของเครื่องมือชุดนี้คือ ใช้น้ำมันเป็นตัวนำความร้อนจากขดลวดให้ความร้อนผ่านไปยังน้ำส้มเปรรดที่ไหลวนตามท่อสแตนเลสลงมา ปลายท่อนี้มีวาล์วปิด-เปิดใช้ในการควบคุมอัตราการไหลออกของน้ำส้มเปรรด เพื่อให้น้ำส้มเปรรดได้รับความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 87 องศาเซลเซียส น้ำส้มเปรรดที่ผ่านการให้ความร้อนจะไหลไปตามท่อสแตนเลสไปยังอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ซึ่งมีเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิของน้ำส้มเปรรด ช่วงแรก ๆ ที่น้ำส้มเปรรดยังมีอุณหภูมิต่ำกว่าที่กำหนดน้ำส้มเปรรดจะถูกสูบป้อนกลับคืนสู่ถังเก็บ เพื่อให้ความร้อนอีกจนกระทั่งน้ำส้มเปรรดมีอุณหภูมิตามต้องการ เมื่อน้ำส้มเปรรดมีอุณหภูมิตามต้องการแล้วจึงปล่อยให้ไหลเข้าถังป้อนน้ำส้มเปรรด ถังป้อนน้ำส้มเปรรดนี้เป็นถังสแตนเลสทรงกระบอก ความจุประมาณ 60 ลิตร สำหรับเก็บน้ำส้มเปรรดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วเพื่อนำไปใช้ในการหมักเอทานอลต่อไป

3.1.2 ระบบหมักเอธานอลแบบต่อเนื่อง

ระบบหมักผลิตเอธานอลแบบต่อเนื่อง ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ

ก. คอลัมน์หมักที่มีการให้อากาศ มีจำนวน 1 คอลัมน์ ตัวคอลัมน์ทำด้วยแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 15 ซม. สูง 100 ซม. ด้านบนมีช่องระบายอากาศ ซึ่งต่ออยู่กับเครื่องกำจัดฟอง โดยไม่ต้องใช้สารกำจัดฟอง ด้านล่างมีหัวกระจายอากาศ คอลัมน์ดังกล่าวทำหน้าที่เพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อใช้ในการหมักเอธานอลในขั้นตอนต่อไป

ข. คอลัมน์หมักที่ไม่มีการให้อากาศ มีจำนวน 8 คอลัมน์ต่ออนุกรมกัน ตัวคอลัมน์เป็นท่อพีวีซีชนิดแข็ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10 ซม. และสูง 100 ซม. ฝาปิดตอนบนเป็นรูปกรวยซึ่งนำมาสวมเข้ากับท่อพีวีซี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ซม. ด้านบนของกรวยอดด้วยจุกยางซึ่งเจาะรูตรงกลาง สำหรับใส่ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 50 ซม. (ความยาวของปลายท่ออยู่ที่ตำแหน่งครึ่งหนึ่งของความสูงของน้ำหมักในคอลัมน์) เพื่อใช้เป็นจุดดึงตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ และเป็นทางออกของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เซลล์ผลิตขึ้น สำหรับฝาปิดคอลัมน์ตอนล่างเป็นรูปกรวยสวมกับท่อพีวีซีเช่นเดียวกับฝาปิดตอนบน ที่ทางออกด้านล่างของคอลัมน์มีท่อแยกออกเป็น 2 ทางทำมุมกัน 90 องศา ทางหนึ่งต่อท่อซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.5 ซม. มีวาล์วปิด-เปิดที่ปลายท่อสำหรับดึงเซลล์และน้ำหมัก ส่วนทางออกอีกทางหนึ่งต่อท่อสั้น ๆ ขนาดเดียวกันในลักษณะที่ตั้งฉากกับท่อแรกจากนั้นต่อท่อวางตั้งฉากขนานขึ้นไปกับตัวคอลัมน์ จนถึงระดับความสูง 75 ซม. แล้วแยกออกเป็น 2 ทางทางหนึ่งเป็นท่อตรงปิดด้วยจุกยางซึ่งเจาะรูตรงกลาง มีหลอดแก้วเสียบไว้สำหรับให้ฟองล้น และเป็นทางออกของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนอีกทางหนึ่งเป็นท่อต่อตั้งฉากกับท่อแรก ปลายท่อมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ต่อเข้ากับคอลัมน์ถัดไป

ระบบหมักดังกล่าวมีกำลังการผลิตไวน์ประมาณวันละ 30 ลิตร โดยไวน์ที่ผลิตได้มีปริมาณความเข้มข้นของเอธานอลร้อยละ 12 แต่ในการทดลองนี้ต้องการไวน์ที่มีปริมาณเอธานอลร้อยละ 7 จึงใช้คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศเพียง 6 คอลัมน์เท่านั้นก็ได้ไวน์ที่มีความเข้มข้นของเอธานอลตามต้องการ

3.1.3 ระบบหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง

ระบบหมักที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูประกอบด้วยเครื่องหมักย่อยที่มีลักษณะเหมือนกัน 4 ชุดต่อเรียงกันเป็นอนุกรม เครื่องหมักย่อยแต่ละชุดประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ

ก. คอลัมน์หมัก ตัวคอลัมน์ทำด้วยท่อพลาสติกใส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.2 ซม. สูง 50 ซม. มีความจุประมาณ 2 ลิตร ภายในคอลัมน์บรรจุวัสดุบรรจุซึ่งทำจากไม้มะค่า วัสดุบรรจุมีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ซม. วัสดุบรรจุนี้ทำหน้าที่ให้แบคทีเรียเกาะอยู่บนผิว เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำหมัก อากาศ และจุลินทรีย์ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการหมักดียิ่งขึ้น (Pederson, 1971) การให้อากาศจะผ่านทางหัวกระจายอากาศทางด้านล่าง น้ำหมักถูกสูบเข้าทางด้านบนโดยไหลผ่านหัวกระจายน้ำหมักที่อยู่ด้านบนของคอลัมน์ ลักษณะเช่นนี้คล้ายเครื่องปฏิกรณ์แบบทริกคลิง เครื่องหมักดังกล่าวช่วยให้มีการสัมผัสกันระหว่างอากาศ น้ำหมัก และจุลินทรีย์สูงและอย่างทั่วถึง น้ำหมักไหลออกจากคอลัมน์หมักลงสู่ถังเก็บที่อยู่ด้านล่างโดยอาศัยหลักการกาลักน้ำ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าลักษณะการทำงานของเครื่องหมักดังกล่าวเป็นทั้งแบบทริกคลิงและแบบขับเมิร์จรวมกัน

ข. ถังเก็บน้ำหมัก มีความจุทั้งหมด 15 ลิตร ภายในถังมีขดน้ำหล่อเย็น เพื่อรักษาอุณหภูมิให้เหมาะสมแก่การหมัก โดยให้อยู่ในช่วง 27-34 องศาเซลเซียส (Prescott, 1959)

เครื่องหมักแต่ละชุดต่อกัน โดยให้สายยางต่อจากด้านล่างของถังเก็บน้ำหมักเครื่องหนึ่งไปยังด้านข้างของถังเก็บน้ำหมักถัดไป สายยางดังกล่าวทำหน้าที่เป็นท่อไหลลงด้วย ภายในถังเก็บน้ำหมักแต่ละชุดบรรจุน้ำหมักประมาณ 12 ลิตร มีการป้อนวัตถุดิบ (ไวน์) เข้ามาอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จึงทำให้น้ำหมักในถังเก็บถังแรกไหลไปสู่ถังเก็บลำดับต่อไปโดยอาศัยการท่วมล้น

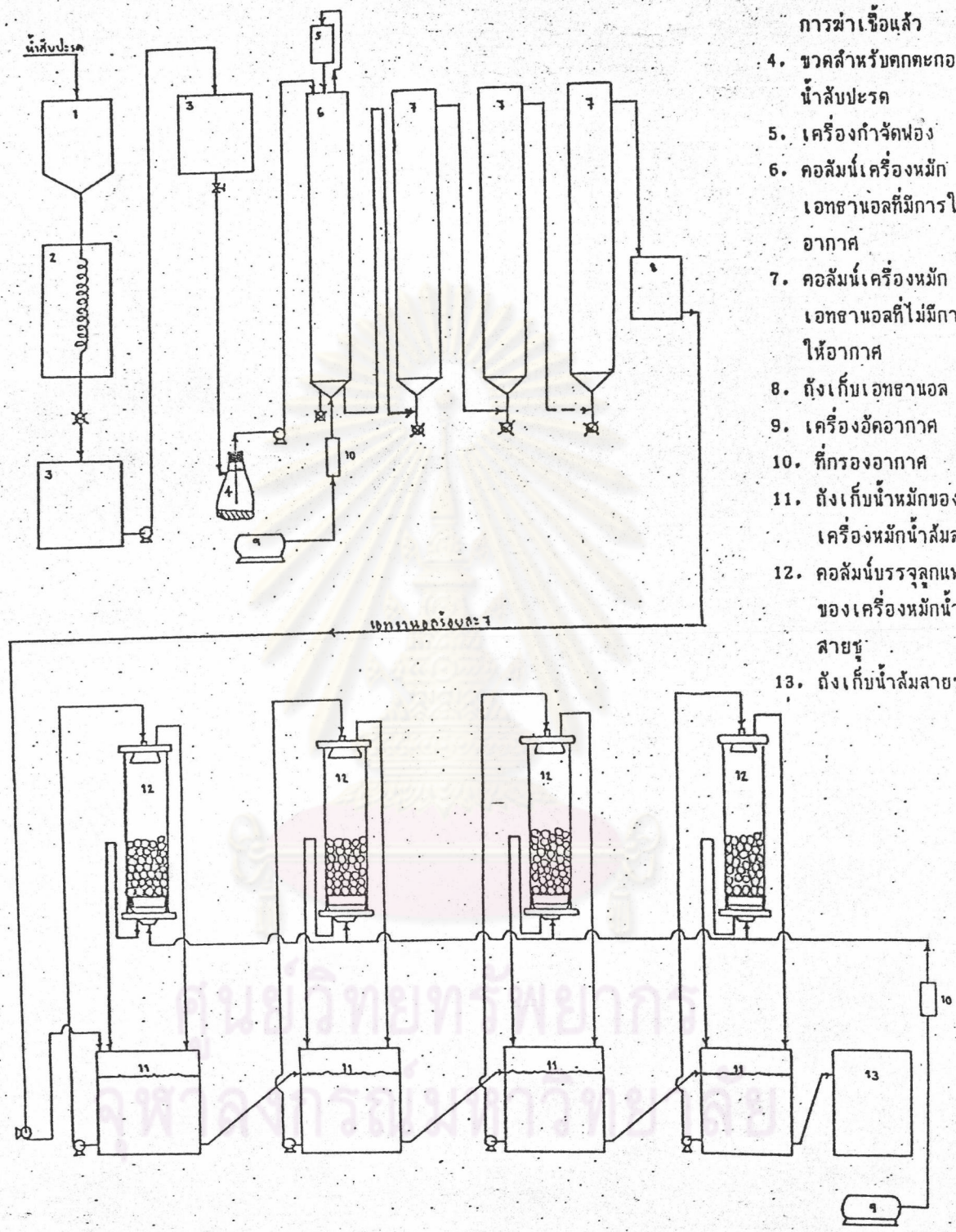
รูปที่ 3.1 แสดงเครื่องหมักที่ใช้ในกระบวนการสมบรูณ์แบบผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องจากน้ำสับปะรด ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วนต่อกันคือ เครื่องพาสเจอร์ไรซ์ ระบบหมักเอธานอลแบบต่อเนื่อง และระบบหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมการหมักเอธานอลแบบต่อเนื่อง

ก. การเก็บรักษายีสต์ ในการทดลองหมักเอธานอลนี้กำหนดให้ใช้สายพันธุ์ *S. cerevisiae* โดยเก็บรักษาเชื้อบนอาหารแข็ง P.D.A. (Potato Dextrose Agar) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกเดือน เชื้อใหม่นี้ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1. ถังพักน้ำสับปะรด
2. เครื่องพาสเจอร์ไรซ์
3. ถังเก็บน้ำสับปะรดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. ขวดสำหรับตกตะกอนน้ำสับปะรด
5. เครื่องกำจัดฟอง
6. คอลัมน์เครื่องหมักเอทานอลที่มีการให้อากาศ
7. คอลัมน์เครื่องหมักเอทานอลที่ไม่มีการให้อากาศ
8. ถังเก็บเอทานอล
9. เครื่องอัดอากาศ
10. ท่อรองอากาศ
11. ถังเก็บน้ำหมักของเครื่องหมักน้ำส้มสายชู
12. คอลัมน์บรรจุลูกแพคของเครื่องหมักน้ำส้มสายชู
13. ถังเก็บน้ำส้มสายชู



รูปที่ 3.1 เครื่องหมักที่ใช้ในกระบวนการสมบูรณ์แบบผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องจากน้ำสับปะรด

ข. การเตรียมวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทานอล ในการทดลองนี้ใช้น้ำส้มประดเข้มข้นเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลประมาณ 5 บริกซ์ หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของน้ำส้มประดให้มีความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเป็น 14 บริกซ์โดยใช้น้ำตาลทรายขาว ปรับความเป็นกรดเป็นด่างให้มีความค่า 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วเติมสารอาหารเสริมซึ่งประกอบด้วยไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) ร้อยละ 0.05, 0.05 และ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ แล้วจึงนำสารละลายที่เตรียมนี้เข้าเครื่องพาสเจอร์ไรส์ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

ค. การเตรียมเครื่องหมักเอทานอล ทำความสะอาดเครื่องหมักเอทานอลโดยแช่ด้วยน้ำยาที่โพล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำประปา ตามด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 80 โดยปริมาตรเพื่อฆ่าเชื้อ (Aiba, 1968) และนำอุปกรณ์กรองอากาศมาทำความสะอาดและทำให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นบรรจุด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยใช้หม้อฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที (วิชาพงษ์, 2525)

ง. เชื้อหมักเริ่มต้น (starter) เตรียมเชื้อหมักเริ่มต้นร้อยละ 5 ของปริมาตรน้ำหมักที่ทำการหมักในคอลัมน์แรกที่มีการให้อากาศ โดยใช้น้ำส้มประดที่เตรียมไว้ตามข้อ ข. แล้วเติมสารอาหารเสริม ซึ่งประกอบด้วยไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, แอมโมเนียมซัลเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.05, 0.05 และ 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ นำไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อต้มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ทำการถ่ายเชื้อยีสต์ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงไปนำไปเข้าเครื่องเขย่านาน 24 ชั่วโมงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หลังจากนั้นนำไปถ่ายลงในคอลัมน์หมักที่มีการให้อากาศด้วยเทคนิคที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้ออื่น

จ. การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง ทำโดยเติมน้ำส้มประดที่เตรียมได้พร้อมทั้งสารอาหารเสริมที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนตามสูตร ลงในคอลัมน์หมักที่มีการให้อากาศและภายในบรรจุเชื้อหมักเริ่มต้นจนมีปริมาตรรวมกัน 8 ลิตร ให้อากาศในอัตรา 0.5 ปปน. (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่ออนาที) ในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการหมักจากนั้นลดอัตราการให้อากาศลงเป็น 0.04-0.06 ปปน. ตลอดการทดลองอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 30-32 องศาเซลเซียสซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง หลังจากเวลาการหมักผ่านไป 21 ชั่วโมง หรือ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในน้ำสับปรดมีค่า 8 บริกซ์ ให้เริ่มป้อนน้ำหมักจากตอนล่างของคอลัมน์ที่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 1) โดยใช้เครื่องสูบลมแบบบริด (peristaltic pump) อัตราการป้อนน้ำสับปรดจึงคงที่ตามต้องการ น้ำหมักไหลลงจากคอลัมน์ที่ 1 เข้าสู่คอลัมน์ที่ไม่มีการให้อากาศ (คอลัมน์ที่ 2) โดยอาศัยระดับที่ต่างกัน แล้วไหลลงจากตอนบนของคอลัมน์ที่ 2 ไปเข้าตอนล่างของคอลัมน์ถัดไป ตามลำดับจนครบ 7 คอลัมน์ อัตราการป้อนน้ำสับปรดถูกควบคุมให้คงที่เท่ากับ 14 มิลลิลิตรต่อนาที ไวน์ที่ได้มีปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลประมาณร้อยละ 7 แล้วนำไวน์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองการหมักน้ำส้มสายชู ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดต่อไป (คนอง, 2532)

3.2.2 การเตรียมการหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง

ก. การเก็บรักษาเชื้อหมัก การเก็บรักษาเชื้อ *Acetobacter aceti* ทำได้โดยนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกเดือนก่อนนำมาใช้ได้ถ่ายเชื้อใหม่ทุกครั้ง แล้วบ่มไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข. การเตรียมระบบหมักน้ำส้มสายชู เตรียมวิธีเดียวกับเครื่องหมักเอทานอล

ค. การฆ่าเชื้อวัสดุบรรจุ วัสดุบรรจุที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 ซม. ทำจากไม้มะค่า นำวัสดุดังกล่าวไปแช่น้ำส้มสายชูที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 5 เพื่อกำจัดกลิ่นและสี ล้างกรดออกด้วยน้ำต้มจนเดือดโดยเปลี่ยนน้ำหลาย ๆ ครั้งจนน้ำที่ต้มใส แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

ง. วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู น้ำหมักที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกได้เป็น 2 พวก คือ

- ไวน์ที่มีเอทานอลประมาณร้อยละ 7 ซึ่งได้จากการหมักในข้อ 3.2.1.จ.

- ไวน์ที่เอทานอลประมาณร้อยละ 10 นำมาเจือจางและพาสเจอร์ไรซ์ตามแนวทางนี้ได้ไวน์ที่มีเอทานอลประมาณร้อยละ 7

จ. เชื้อหมักเริ่มต้น ทำการถ่ายเชื้อ *A. aceti* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงลงไปในการเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อาหารเลี้ยงนี้ประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แทรกต์, เปปโตน, แมนนิทอล และไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.05, 0.03, 0.05 และ 0.30

โดยนำหนักต่อปริมาตรตามลำดับ นำส่วนนี้ไปเติมลงในคอลัมน์หมักที่ภายในบรรจุวัสดุบรรจุ 180 ลูก และมีน้ำหนักที่เติมลงไปคอลัมน์ด้วยเทคนิคที่ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น เพื่อทำเป็นเชื้อหมักเริ่มต้น ตามหลักทั่วไปให้ใช้เชื้อหมักเริ่มต้นมีปริมาตรคิดเป็นร้อยละ 20 ของปริมาตรน้ำหมักที่ทำการหมักในเครื่องหมักแต่ละชุด หรือเท่ากับ 2.4 ลิตร (เมื่อปริมาตรของน้ำหมักในเครื่องหมักแต่ละชุดเป็น 12 ลิตร) แต่คอลัมน์มีความจุเพียง 2 ลิตรจึงบรรจุน้ำหมักได้เพียง 1.5 ลิตร (นั่นคือมีเชื้อหมักเริ่มต้นร้อยละ 12.5 ของปริมาตรน้ำหมักในเครื่องหมักแต่ละชุด) หลังจากนั้นให้อากาศผ่านหัวกระจายอากาศในอัตรา 0.05 ปปน. นาน 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นเติมน้ำหมักส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 80 ลงในถังเก็บ และปล่อยเชื้อหมักเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในคอลัมน์ลงสู่ถังเก็บ เปิดปั๊มหมุนเวียนพร้อมกับปรับอัตราการไหลของน้ำหมักและอากาศตามต้องการ

ฉ. การเตรียมการหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง เมื่อเตรียมเครื่องหมักทั้ง 4 ชุดโดยมีน้ำหมักบรรจุอยู่เรียบร้อยแล้ว ทำการเดินเครื่องและควบคุมความเข้มข้นของกรดอะซิติกในถังเก็บน้ำหมักที่ 1, 2, 3 และ 4 ให้ได้ร้อยละ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ แล้วจึงต่อเครื่องทั้ง 4 เข้าด้วยกันเป็นอนุกรม เพื่อทำการป้อนน้ำหมักเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่องทางด้านบนของถังเก็บน้ำหมักที่ 1 โดยต่อสายยางให้น้ำหมักไหลออกจากทางด้านล่างของถังเก็บน้ำหมักที่ 1 เข้าสู่ด้านบนของถังเก็บน้ำหมักที่ 2 และไหลออกจากทางด้านล่างของถังเก็บน้ำหมักที่ 2 ไปสู่ถังถัดไป ตามลำดับจนครบ 4 ถัง เพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึงและแน่ใจว่าน้ำหมักที่ออกจากแต่ละถังมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกตามที่กำหนดอย่างแท้จริง เครื่องหมักแต่ละชุดมีอัตราการให้อากาศไม่ขึ้นต่อกัน โดยคอลัมน์หมักที่ 1 และ 2 มีอัตราการให้อากาศเป็น 0.06 ปปน. ส่วนในคอลัมน์หมักที่ 3 และ 4 มีค่าเป็น 0.04 ปปน. อัตราการไหลเวียนของน้ำหมักในเครื่องมีค่าเท่ากันทั้งหมดคือ 2.8 ลิตรต่อนาที น้ำหมักถูกปั๊มจากทางด้านล่างของถังเก็บน้ำหมักขึ้นไปยังด้านบนของคอลัมน์หมัก แล้วไหลผ่านหัวกระจายน้ำหมักลงสู่วัสดุบรรจุภายในคอลัมน์ เมื่อระดับน้ำหมักท่วมวัสดุบรรจุ น้ำหมักจะถูกดูดลงสู่ถังเก็บน้ำหมักที่อยู่ด้านล่าง โดยอาศัยหลักการกาลักน้ำ (siphon) (ประพนธ์, 2531)

3.2.3 ขั้นตอนการทดลองผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง

โดยใช้ระบบหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่องที่มีเครื่องหมักย่อยจำนวน 4 ชุดต่อกัน และควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลองให้อยู่ในช่วง 27 - 34 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (ประพนธ์, 2531) การทดลองนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ช่วง โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง โดยไม่มีการนำผลิตภัณฑ์มาป้อนย้อนกลับ

ในการทดลองนี้ได้ควบคุมอัตราการป้อนไวน์ให้คงที่ 4.5, 5.0 และ 7.0 มิลลิลิตรต่อนาที คิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0225, 0.0250 และ 0.0350 ชม.⁻¹ ตามลำดับ โดยไวน์ที่ใช้ในช่วงนี้ถูกควบคุมให้มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 7 ตลอดช่วงการทดลองโดยไม่ผ่านการเจือจางและพาสเจอร์ไรซ์ ทำการเก็บตัวอย่างไวน์และน้ำหมักตลอดช่วงสภาวะไม่คงที่และสภาวะคงที่ นำตัวอย่างเหล่านี้ไปวิเคราะห์อัตราชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบผลเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับระบบหมักน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง รายละเอียดการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์จะได้กล่าวต่อไป

ข. การศึกษาทดลองเพิ่มประสิทธิภาพของระบบหมัก โดยการนำเอาผลิตภัณฑ์บางส่วนมาป้อนย้อนกลับ

การทดลองนี้แบ่งได้เป็น 2 ช่วง คือ

- นำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถังเก็บน้ำหมักที่ 4 มาป้อนย้อนกลับเข้าสู่ถังเก็บน้ำหมักที่ 1 โดยควบคุมอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับ (recycle ratio = อัตราการป้อนย้อนกลับต่ออัตราการป้อนไวน์) เป็น 1.00 และ 0.81 ที่อัตราการป้อนไวน์คงที่ 5.0 และ 6.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ หรือคิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0250 และ 0.0310 ชม.⁻¹ น้ำหมักที่ใช้ในช่วงนี้คือไวน์ที่ผ่านการเจือจางจนมีความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลประมาณร้อยละ 7 และพาสเจอร์ไรซ์แล้ว ทำการเก็บตัวอย่างดังเช่นข้อ 3.2.3.1

- นำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถังเก็บน้ำหมักที่ 3 มาป้อนย้อนกลับเข้าสู่ถังเก็บน้ำหมักที่ 1 โดยควบคุมอัตราส่วนการป้อนย้อนกลับเป็น 1.00, 0.71 และ 0.54 ที่อัตราการป้อนไวน์คงที่ 5.0, 7.0 และ 7.9 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ หรือคิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0250, 0.0350 และ 0.0395 ชม.⁻¹ ตามลำดับ น้ำหมักที่ใช้การทดลองนี้เป็นไวน์ที่ผ่านการเจือจางจนมีความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลประมาณร้อยละ 7 และพาสเจอร์ไรซ์แล้ว ทำการเก็บตัวอย่างดังเช่นข้อ 3.2.3.ก.

นำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์อัตราชนิดต่าง ๆ และเปรียบเทียบผลของการนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถังเก็บน้ำหมักที่ 4 และ 3 มาป้อนกลับสู่ถังเก็บน้ำหมักที่ 1 และหาอัตราส่วนการป้อนกลับที่ดีที่สุดที่ได้จากการทำการทดลองในช่วงดังกล่าว จากนั้นเปรียบเทียบผลของการทดลองเมื่อไม่มีการนำผลิตภัณฑ์มาป้อนย้อนกลับกับเมื่อมีการนำเอาผลิตภัณฑ์บางส่วนมาป้อนย้อนกลับ

ค. ศึกษาผลของจำนวนชุดของเครื่องหมักที่มีผลต่อระบบหมัก

ศึกษาผลของจำนวนชุดของเครื่องหมักที่ใช้ในระบบผลิตน้ำส้มสายชูแบบต่อเนื่อง โดยการนำเอาข้อมูลดิบที่ได้มาวิเคราะห์หาตรรกะที่ต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ ปริมาณเอทานอลที่ถูกนำไปใช้ (% ethanol uptake) กำลังการผลิต และประสิทธิภาพการสร้างกรดอะซิติก โดยแยกข้อมูลเป็น 4 ชุด คือ เมื่อมีเครื่องหมัก 1 ชุด เมื่อมีเครื่องหมัก 2 ชุดต่ออนุกรมกัน เมื่อมีเครื่องหมัก 3 ชุดต่ออนุกรมกัน และเมื่อมีเครื่องหมัก 4 ชุดต่ออนุกรมกัน

ง. ศึกษาหาน้ำหนักเซลแห้งและเปียกของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละคอลัมน์

หลังจากที่หยุดการทดลองย่อยบางการทดลอง ได้ทำการหาน้ำหนักเซลแห้งและเปียกของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในแต่ละคอลัมน์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

- นำวัสดุบรรจุ 180 ลูก และเมือกทั้งหมดที่อยู่ภายในคอลัมน์ไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าไว้ได้เป็นน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุรวมกับเมือก

- นำวัสดุบรรจุและเมือกทั้งหมดไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในเตาสลิเคเตเตอร์ (dessicator) แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าไว้ได้เป็นน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุรวมกับเมือก

- นำวัสดุบรรจุไปล้างให้สะอาดปราศจากเมือก แช่ทิ้งไว้จนกระทั่งแน่ใจว่าอิมด้วยน้ำ นำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกค่าไว้ ได้เป็นน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุ

- นำวัสดุบรรจุที่อิมด้วยน้ำไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในเตาสลิเคเตเตอร์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าไว้ ได้เป็นน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุ

- เมื่อหักน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุ ออกจากน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุรวมกับเมือก จะได้เป็นน้ำหนักเปียกของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในคอลัมน์ เมื่อหารด้วยน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุ จะได้เป็นน้ำหนักเปียกของเซลล์ต่อน้ำหนักเปียกของวัสดุบรรจุ

- เมื่อหักน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุ ออกจากน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุรวมกับเมือก จะได้เป็นน้ำหนักแห้งของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในคอลัมน์ เมื่อหารด้วยน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุ จะได้เป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ต่อน้ำหนักแห้งของวัสดุบรรจุ

จ. ศึกษาอัตราการระเหยของเอทานอล

ทำการทดลองหาอัตราการระเหยของเอทานอล โดยเดินเครื่องเปล่า ไม่มีการเติมเชื้อ และไม่ใส่วัสดุบรรจุภายในคอลัมน์ ควบคุมอัตราการให้อากาศให้อยู่ในช่วง 0.04-0.06 ปปน. อัตราการไหลเวียนของน้ำหมักภายในเครื่องเท่ากับ 2.8 ลิตรต่ออนาที

การไหลเวียนของน้ำหมักภายในเครื่องเป็นแบบกาลักน้ำ และควบคุมอุณหภูมิของการหมักให้อยู่ในช่วง 27-34 องศาเซลเซียส มีการเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 26 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้มีสภาพเป็นพิษไม่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ใด ๆ และช่วยให้แน่ใจว่าระบบดังกล่าวปราศจากเชื้ออย่างแท้จริง ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เหลืออยู่ในน้ำหมักเทียบกับเวลา

3.2.4 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ก. ปริมาณกรดอะซิติก ใช้วิธีของ A.O.A.C. (Official Method of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 1980)

ข. ปริมาณเอทานอล ใช้วิธีของ A.O.A.C.

ค. ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)

ง. ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในน้ำหมัก วัดเป็นปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) หน่วยเป็นบริกซ์ โดยใช้รีแฟรคโตมิเตอร์

จ. ความเป็นกรดเป็นด่าง ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-meter) และกระดาษวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH-paper)

ฉ. อนุกรมมิ ใช้เทอร์โมมิเตอร์

ทำการเก็บตัวอย่างโดยตักน้ำหมักจากถังเก็บไวน์ และถังเก็บน้ำหมักที่ 1, 2, 3 และ 4 ทุกวันเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ การวิเคราะห์ตามข้อ ข., ค. และ จ. นั้นทำการวิเคราะห์วันละ 1 ครั้ง ส่วนการวิเคราะห์ตามข้อ ก., ค. และ จ. นั้นทำการวิเคราะห์วันละ 2-3 ครั้ง ข้อมูลที่รวบรวมได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง แสดงไว้ในภาคผนวก ข. (ตารางที่ ข.1.- ข.12.)

สำหรับรายละเอียดของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณเอทานอล และปริมาณจุลินทรีย์ แสดงไว้ในภาคผนวก ค.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย