บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Shaker)
2. เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 5100 บริษัท Kubota Corporation, Japan
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Instrument, USA
4. ตู้ถ่ายเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น VS-124 บริษัท ISSCO, USA
5. หม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HL24ADY บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan
6. ถังปฏิกรณ์หรือถังหมัก ขนาด 10 ลิตร
7. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น BH-2 บริษัท Olympus Microscope, Japan
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Mettler Tolledo, Switzerland
9. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven) รุ่น ULM 500 บริษัท Menmert, Germany
10. ปั๊มรีด(Peristaltic pump)
    - 10.1 รุ่น Watson-Marlow 505U บริษัท Watson-Marlow Limited, England
    - 10.2 รุ่น MasterFlex 7518-10 บริษัท Cole Parmer Instrument. Co., LTD, USA
11. เครื่องตั้งเวลา (Timer)
12. เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบ PID (PID temperature controller)
13. เครื่อง Gas Chromatography (CG) Shimadzu รุ่น 7AG

3.1.2 **สารเคมี**

1. กรดไฮโดรคลอริค [HCl] บริษัท MERCK, Germany[LB]
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH] บริษัท CARLO ERBA, Italy[LB]
3. แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] บริษัท CARLO ERBA, Italy
4. โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท [$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$] บริษัท CARLO ERBA, Italy[LB]
5. 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิค แอซิก [$C_7H_4N_2O_7$] บริษัท FLUKA CHEMICAL, Switzerland[LB]
6. กากน้ำตาล ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการผลิตแอลกอฮอล์ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา[CM]
7. เอทิลแอลกอฮอล์ แอนไฮดรัส สำหรับ HPLC 99.8 % (v/v) ของบริษัท ITALMAR CO., LTD FRANCE[AL]
8. น้ำกลั่น[AL]
9. น้ำรีเวอร์สออสโมซีส (RO)[LB]
10. โปเตโตเดร็กโทรสเอการ์ (Potato dextrose agar) บริษัท Becton, Dickinson and Company, France[LB]
11. สารประกอบโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์[CM]

หมายเหตุ : ความบริสุทธิ์ของสารเคมี [AL] ระดับ Analytical grade [LB] ระดับ Lab grade และ [CM] ระดับ Commercial grade

3.2 **เชื้อจุลินทรีย์**

ในการทดลองใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ใช้อาหารโปเตโตเดร็กโทรสเอการ์ แบบแข็งเอียง (Potato Dextrose Agar slant)

3.3.2 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเหลวสำหรับเตรียมทำหัวเชื้อ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

กากน้ำตาล (Assume reducing sugar 50 %)	22	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.05	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย น้ำ RO แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างใช้ได้ 5 (pH 5) แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยการนำไปใส่ในหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ใช้อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส (หรือที่ความดัน 1.5 บาร์) เป็นเวลา 20 นาที

3.3.3 อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ แต่แตกต่างกันตรงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์

3.4 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 วิธีเก็บรักษาระยะยาว

เก็บเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้เจริญจนเข้าสู่ช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญ (stationary phase) หลังจากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใส่ในอาหารสำหรับป้องกันเซลล์ โดยส่วนมากจะใช้ 10 % กลีเซอรัล(glycerol)ในนิวเทรียนบรอท (nutrient broth,NB) แล้วบรรจุลงแอมพูล นำไปแช่แข็งแล้วทำให้แห้งภายใต้ระบบสุญญากาศ จนกระทั้งน้ำในเซลล์ระเหิดไปหมด จากนั้นจึงปิดแอมพูลให้สนิทแล้วเก็บในตู้เย็น การเก็บเชื้อโดยวิธีนี้จะสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานถึง 10 ปี หรือมากกว่า เมื่อต้องการนำออกมาใช้ จึงถ่ายเชื้อลงในสารละลายเหลวสำเร็จรูป (NB, PDB) เพื่อเพิ่มปริมาณและบำรุงเซลล์ให้แข็งแรง

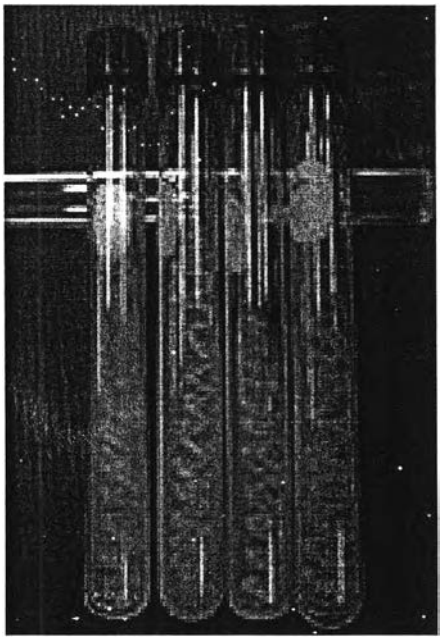
3.4.2 วิธีเก็บเชื้อระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่าเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดโปเตโตเดร็กโทรสเอการ์แบบแข็งเอียง (potato dextrose agar slant) ในหลอดฝาเกลียวขนาด 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ ไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส

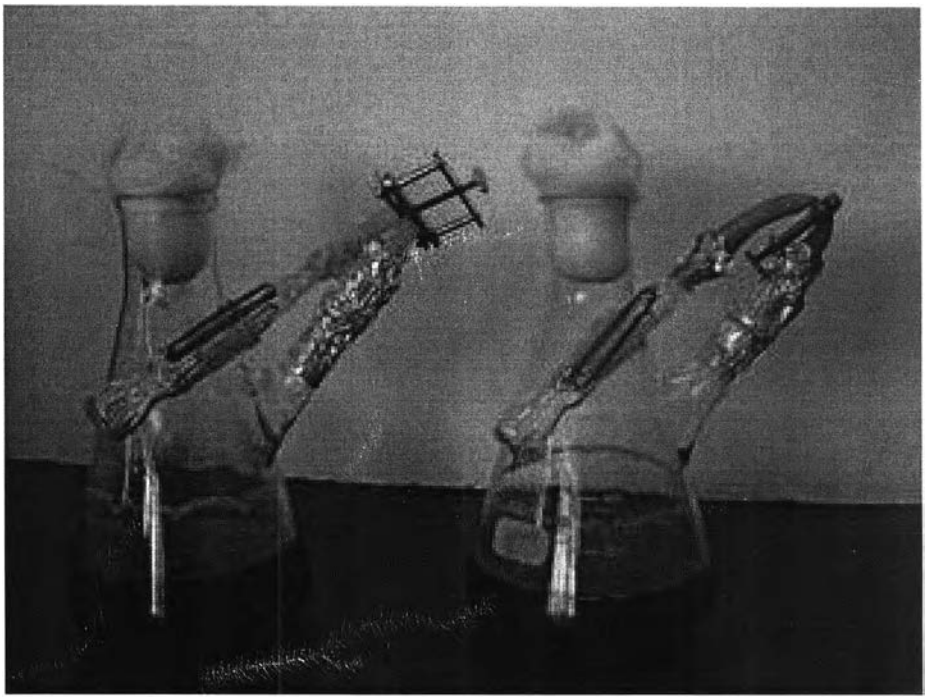
3.5 ขั้นตอนการทดลอง

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงใน PDA slant ในหัวข้อ 3.4.2 มาเขี่ยลง บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดโปเตโตเดร็กโทรสเอการ์แบบแข็งเอียง (ดังรูปที่ 3.1) นำไปบ่มที่ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทำหัวเชื้อ (เตรียมตามสัดส่วนจากข้อ 3.3.2) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลินทรีย์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (ดังรูปที่ 3.2) จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 แสดงภาพถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารโปเตโตเดร็กโทรสเอการ์แบบแข็งเอียง



รูปที่ 3.2 แสดงภาพถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้น

3.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

ในงานวิจัยนี้ทำการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่ารูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณสารอาหาร (ในงานวิจัยนี้สนใจปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็นหลัก) ที่เหมาะสมที่เชื้อจะสามารถนำไปเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอล โดยวิธีเพาะเลี้ยงจะเตรียมอาหาร สำหรับเลี้ยงเชื้อตามสัดส่วนตามข้อ 3.3.3 แตกต่างตรงที่ปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้ในแต่ละขวด ปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ดังแสดงรูปที่3.3) แล้วทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงในปริมาตร 3 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ น้ำตาล และ เอทานอล ต่อไป

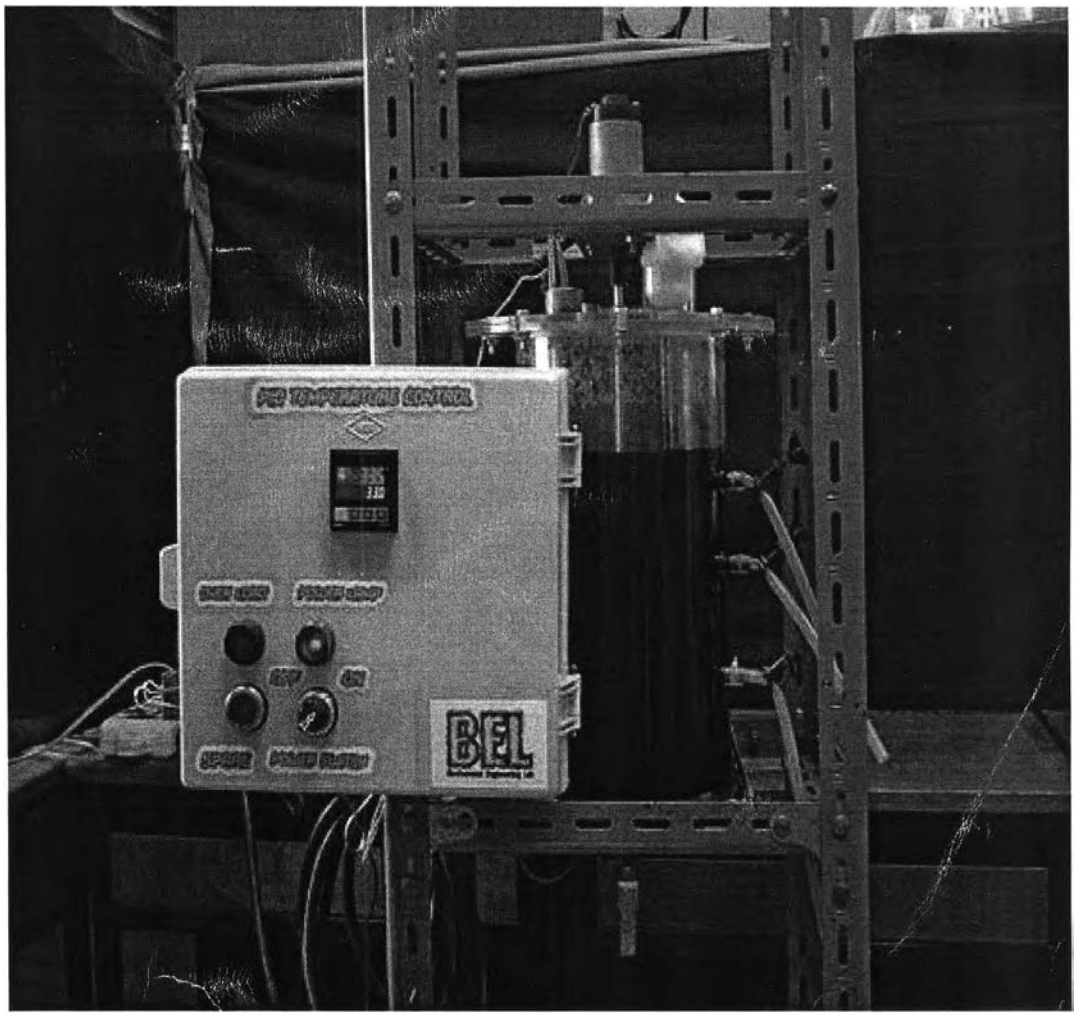
รูปที่ 3.3 ภาพถ่ายแสดงการหมักในขวดเขย่ารูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.5.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์หรือถังหมัก (Fermentor) ขนาด 7 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง ชนิด1 ขั้นตอน

ถังหมักปริมาตรรวม 10 ลิตร และมีปริมาตรใช้งาน 7 ลิตร ทำจากท่ออะคริลิกทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 19 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก ขนาด 20 เซนติเมตร สูง 35.5 เซนติเมตร มีท่อสำหรับเก็บตัวอย่างที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางท่อภายในขนาด 8 มิลลิเมตร จำนวน 3 ท่อ อยู่สูงจากก้นถัง 8 , 17 และ 25 เซนติเมตร ตามลำดับ มี baffle จำนวน 4 ชิ้นติดอยู่ภายในถังหมัก ฝาปิดทำด้วยแผ่นอะคริลิก หนา 1เซนติเมตร มีช่องสำหรับใส่สารและอากาศจำนวน 3 ช่อง ประกอบด้วยช่องที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน ขนาด 1.4 เซนติเมตร 2 ท่อ และขนาด 1.4 เซนติเมตร 1 ท่อ ชุดปั่นกวนประกอบด้วยมอเตอร์แบบมีเฟืองทดที่สามารถปรับความเร็วรอบได้ (ไฟกระแสตรง 24 โวลต์) ใบพัดสแตนเลสแบบ 4-bladed disk turbine จำนวน 3 ใบพัด ติดตั้งกับแกนหมุนทำจากสแตนเลสโดยใบพัดห่างจากก้นถัง 5 , 12.5 และ 20 เซนติเมตร ตาลำดับ มีการควบคุม ความเร็วในการปั่นกวน โดยการปรับความต่างศักย์ของไฟฟ้าที่จ่ายเข้ามอเตอร์ อุณหภูมิภายในถังถูกควบคุมโดยใช้ชุดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติแบบ PID (PID temperature controller) ทำการฆ่าเชื้อ โดยการเติมสารละลายโซเดียไฮเปอร์คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นของคลอรีน 1000 ส่วนในล้านส่วน (ppm) จำนวน 9 ลิตร ปั่นกวนที่

ความเร็ว 300 รอบต่อนาที 15 นาที แล้วเททิ้ง เติมน้ำร้อน อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า จำนวน 9 ลิตร ปั่นกวนที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที 15 นาที แล้วเททิ้งแล้วเติมน้ำร้อนซ้ำอีกครั้ง

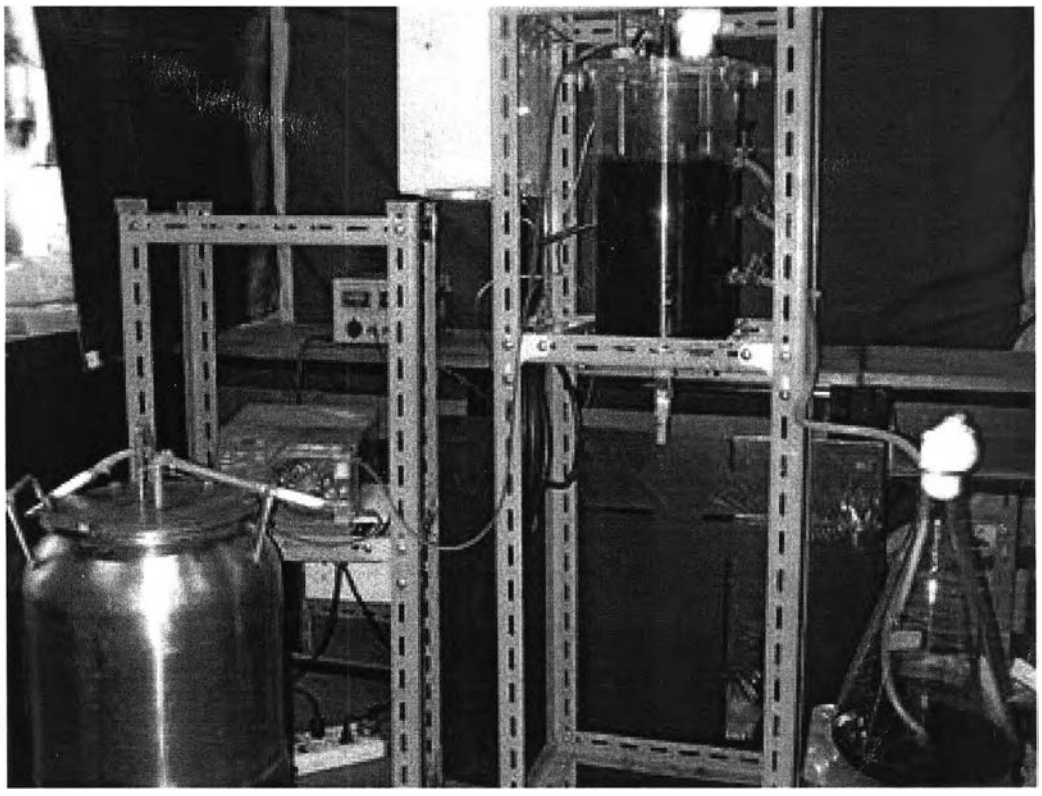
เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนตามข้อ 3.3.3 (น้ำตาลรีดิวซ์ ร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) 7 ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อ โดยการนำไปใส่ในหม้อฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ใช้อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส (หรือที่ความดัน 1.5 บาร์) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ (ดังรูปที่ 3.4) ปรับอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 33 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนด้วยความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.5.1 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ถังปฏิกรณ์ ในสภาพปลอดเชื้อ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองนี้อีก 1 ครั้ง



รูปที่ 3.4 แสดงการหมักแบบไม่ต่อเนื่องในถังหมักขนาด 7 ลิตร

3.5.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องชนิดหนึ่งขั้นตอน ในถังหมักขนาด 7 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนตามข้อ 3.3.3 (น้ำตาลรีดิวซ์ ร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ไว้สำหรับเติมขณะที่ทำการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง แล้วทำตามข้อ 3.5.3 จนกระทั่งเวลาชั่วโมงที่15 หลังจากการถ่ายหัวเชื้อลงถังปฏิกรณ์ จึงป้อนอาหารเลี้ยงที่เตรียมไว้ข้างต้น ลงไปสู่ถังหมักด้วยปั๊มรีดในอัตราการไหล 0.184 ลิตรต่อชั่วโมง (อัตราการเจือจางเป็น 1/38 ต่อ ชั่วโมง) และควบคุมระดับในถังหมักด้วยระบบไหลล้น (overflow) (ดังรูปที่ 3.5) ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่งโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ เมื่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่ ปล่อยให้ป้อนอาหารด้วยอัตราเดิมต่อไปอีกอีก 12 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนอัตราการป้อนอาหารเป็น 0.28 ลิตรต่อชั่วโมง (อัตราการเจือจางเป็น 1/25 ต่อชั่วโมง) ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเซลล์ และ เอทานอลต่อไป นำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์หาอัตราการป้อนสารอาหาร (Feed flow rate,F)ที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



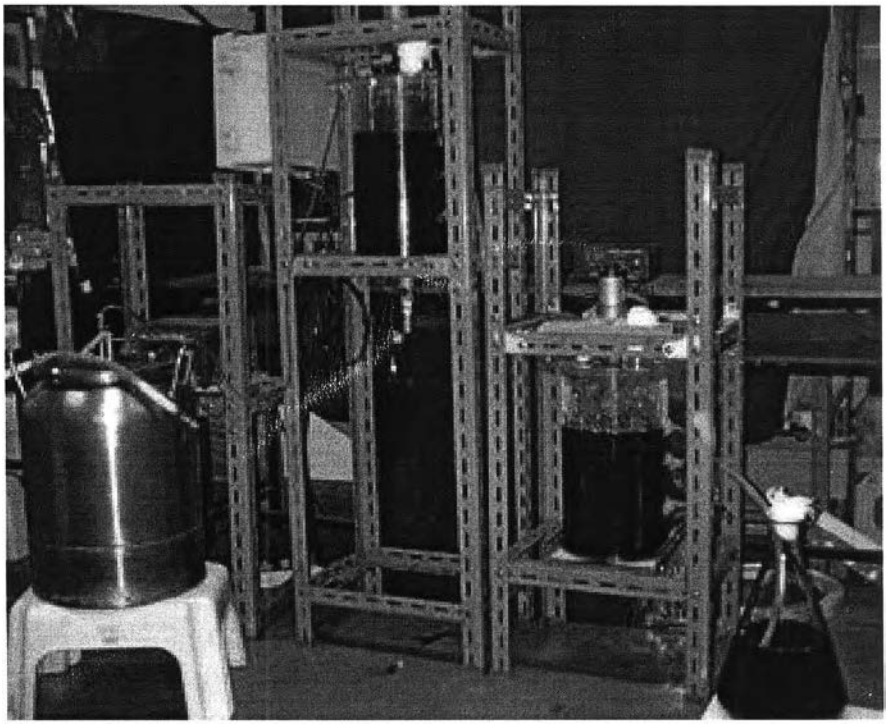
รูปที่ 3.5 แสดงการหมักแบบต่อเนื่องชนิดหนึ่งขั้นตอน ในถังหมักขนาด 7 ลิตร

3.5.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องชนิดสองขั้นตอนและการหมักแบบต่อเนื่องชนิดสองขั้นตอนที่มีการเวียนกลับเซลล์

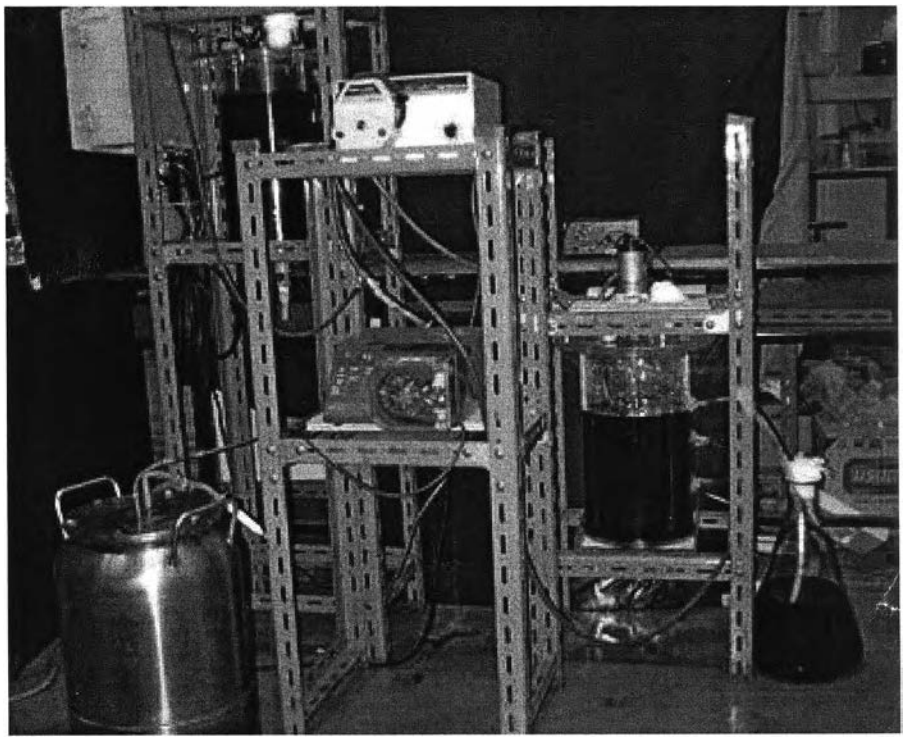
ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4 เพียงแต่เพิ่มถังหมักอีก 1 ใบ โดยสารที่ออกจากด้านบนของถังหมักใบที่ 1 จะเป็นสายที่ป้อนเข้าสู่ถังหมักที่ 2 ทางด้านบน (ดังรูปที่ 3.7) ทำการเลี้ยงเชื้อด้วยการหมักแบบไม่ต่อเนื่องทั้ง 2 ถังเป็นเวลา 15 ชั่วโมงจากนั้น เริ่มป้อนสารอาหารสู่ถังหมักที่ 1 จนระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (ประมาณชั่วโมงที่ 130) สารที่ไหลล้นออกจากถังหมักใบที่ 1 จะไหลเข้าสู่ถังหมักที่ 2 ในอัตราเดียวกับอัตราการป้อนอาหารเข้าสู่ถังหมักที่1 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6-8 ชั่วโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการดึงเซลล์จากก้นของถังหมักใบที่ 2 ด้วยปั๊มรีดเพื่อป้อนกลับสู่ถังหมักใบที่ 1 (โดยถังหมักที่ 2 มีการตั้งโปรแกรมการปั่นกวนเป็นระยะๆ คือ หยุดปั่นกวน 7 นาที สลับกับมีการปั่นกวนที่ 50 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 8 -12 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเซลล์ และ ความเข้มข้นเอทานอล

3.5.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องชนิดหนึ่งขั้นตอนต่อกับถังตกตะกอนเพื่อเวียนกลับเซลล์

นำผลวิเคราะห์ที่ได้จากข้อ 3.5.5 มาปรับปรุงระบบการผลิตโดยทำการเลี้ยงเชื้อ โดยหมักแบบไม่ต่อเนื่องทั้ง 2 ถังเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปั่นกวน 1.5 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มีการตกตะกอน จากนั้นทำการดึงส่วนใสด้านบนออกร้อยละ 70 ของปริมาตรทั้งหมดทั้ง 2 ถัง ต่อจากนั้น เติมอาหารที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ได้ปริมาตรเท่ากับดึงออกมา ทำการเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องอีก 15 ชั่วโมงจึงเปลี่ยนเป็นการเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยการป้อนอาหารเข้าสู่ถังหมักที่ 1 ด้วยอัตราการป้อน 0.184 ลิตรต่อชั่วโมง (อัตราการเจือจางเป็น 1/38 ต่อ ชั่วโมง) พร้อมกับทำการดึงเซลล์จากบริเวณส่วนก้นของถังหมักที่ 2 กลับสู่ถังหมักที่ 1 ด้วยการอัตราการเวียนกลับเป็น 0.031 ลิตรต่อชั่วโมง (1 ใน 6 เท่าของอัตราการป้อนอาหาร เข้าสู่ถังหมักที่ 1) ทำเก็บตัวอย่างทุก 8 -12 ชั่วโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตรจนกระทั้งระบบเข้าสู่สภาวะคงที่ (ประมาณ 130 ชั่วโมงหลังการเริ่มมีการดึงเซลล์) ทำการปรับเปลี่ยนอัตราการเวียนกลับให้เป็น 0.062 ลิตรต่อชั่วโมง (1ใน 3 เท่าของการป้อนอาหาร เข้าสู่ถังหมัก 1) ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในถังหมักที่ 1 จะมีการปั่นกวนที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาทีตลอดเวลา ขณะที่ถังหมักที่ 2 จะทำการปั่นกวนที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลาทุกๆ 15 นาทีสลับกับหยุดปั่นกวน 75 นาที โดยจะเริ่มตั้งแต่มีการป้อนอาหารเข้าถังหมักที่ 1 พร้อมกับมีการเวียนกลับเซลล์จากถังหมักที่ 2 กลับสู่ถังหมักที่ 1



รูปที่ 3.6 แสดงการหมักต่อเนื่องในถังหมักขนาด 7 ลิตร แบบสองขั้นตอน



รูปที่ 3.7 แสดงการหมักต่อเนื่องในถังหมักขนาด 7 ลิตร แบบสองขั้นตอน และมีการเวียนกลับเซลล์

I21567184

3.6 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

3.6.1 การหาจากน้ำหนักเซลล์แห้ง

น้ำหนักเซลล์แห้ง เป็นค่าที่สำคัญในการคำนวณหาค่าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อค่าอื่นๆที่สำคัญ เช่น Productivity และ yield เนื่องจากเป็นค่าที่ใช้แสดงความสัมพันธ์โดยตรงกับองค์ประกอบของเซลล์ (cell composition) โดยปกติ เซลล์ของจุลินทรีย์ก็เหมือนกับเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นๆคือประกอบด้วยน้ำ(intracellular water) ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำภายในเซลล์แตกต่างกันมาก ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ และระยะต่างๆของการเจริญเติบโต ในขณะที่น้ำภายนอกเซลล์(intercellular water) ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ในการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณสมบัติของอาหารและคุณสมบัติของเชื้อ การหาน้ำหนักแห้ง เป็นการเอาน้ำออกจากทั้งภายในและภายนอกเซลล์ให้หมด คงเหลือไว้แต่สาร ประกอบ เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิค เป็นต้น วิธีการหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แสดงไว้ในภาคผนวก ค1.1

3.6.2 การวัดค่าความขุ่น

โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ตรวจวัดการกระจายของแสง (light scattering) ที่ความยาวช่วงคลื่นของแสงเท่ากับ 660 นาโนเมตร ซึ่งปกติใช้กับยีสต์ ข้อควรระวังคือ ค่า OD ที่อ่านได้ มีช่วงจำกัดที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณจำนวนของเชื้อ เพราะฉะนั้น ถ้า OD มีค่าสูงเกินไป จะต้องทำ dilution ใช้จำนวนเชื้อเจือจางลงก่อน จึงจะทำการวัดได้ถูกต้อง โดยใช้ medium หรือน้ำกลั่น เป็น blank วิธีวัดค่าความขุ่นแสดงในภาคผนวก ค1.2

3.6.3 การนับจำนวนเซลล์

เป็นวิธีที่รวดเร็วในการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการเพิ่มจำนวน และสามารถตรวจหาเชื้อปะปนได้ด้วย ถ้าอาหารเลี้ยงไม่มีสีเข้ม หรือทึบเกินไป แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกระหว่างเซลล์ที่มีชีวิตละเซลล์ที่ตายแล้วได้ ในกรณีของยีสต์ สามารถใช้สี Methylene Blue ย้อมช่วยในการแบ่งแยกได้ เพราะยีสต์ที่มีชีวิต จะมีกลไกลในการกำจัดสีฟ้าของ Methylene Blue ออกได้ วิธีการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer แสดงในภาคผนวก ค1.3 ดังนั้นควรหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง OD กับ Total cell count และระหว่าง Total cell count กับ Dry Cell Weight ไว้ เพื่อนำไปวาดกราฟมาตรฐานที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก. ในงานวิจัยนี้เราจะนับจำนวนเซลล์รวมโดยจะไม่มีการแยกเชื้อที่เป็นหรือ ตายออกจากกัน

3.7 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ในงานวิจัยนี้จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารตัวอย่าง โดยการประยุกต์จากวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS) (Miller, 1959) ทำได้โดยนำสารตัวอย่างมาทำการย่อยสลายด้วยกรดเกลือก่อน ต่อจากนั้นนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย วิธี DNS ดังแสดงในภาคผนวก ค2

3.8 การหาปริมาณเอทานอล

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น สามารถวัดได้โดยใช้ Gas Chromatography (GC) Shimadzu รุ่น 7AG มี detector เป็นแบบ flame ionization (FID) ที่ใช้ประกอบด้วยคอลัมน์ที่ทำจากสแตนเลส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.125 นิ้ว ยาว 2 เมตร (บรรจุด้วย Porapack Q 80-100 mesh) ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส ใช้ไนโตรเจน เป็น carrier gas มีอัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส วัดที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส โดยเครื่องจะดูดซับแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์อื่นๆไว้แล้วปล่อยออกมาเป็นลำดับ จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปแปรผลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ก. (ดังรูปที่ ก5.) และวิธีการเตรียมตัวอย่างแสดงในภาคผนวก ค3