บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Saccharomyces cerevisiae NP 01 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (YM broth) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทำกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมักต่อไป

3.1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำยีสต์ในอาหารแข็ง YM (YM agar) มาเลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมัก

3.2 วัสดุอุปกรณ์และการเตรียมวัตถุดิบ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเหลว YM (yeast extract malt extract broth) อาหารเหลว YM ประกอบด้วย

ยีสต์เอ็กแทร๊กท์ (yeast extract)	3.0 กรัมต่อลิตร
มอลท์เอ็กซ์แทร๊กท์ (malt extract)	3.0 กรัมต่อลิตร
เปปโทน (peptone)	5.0 กรัมต่อลิตร
กลูโคส (glucose)	10.0 กรัมต่อลิตร

2) อาหารแข็ง YM (YM agar) เหมือนสูตรอาหารเหลว YM แต่เพิ่มวุ้น (agar) ร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.2.2 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมัก

นำน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเข้มข้น (ซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 74 องศาบริกซ์) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเป็น 280 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (Biostat B, B. Braun, Germany) ที่มีปริมาตรทำงาน 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ก่อนนำไปใช้ในการหมัก

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อสารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. กรดซัลฟิวริก, 98 % (w/w) (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์, 99 % (w/w) (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
3. ฟีนอล (เกรดวิเคราะห์), 99.5 % (w/w)	MERK, Germany
4. แบเรียมคลอไรด์ (เกรดวิเคราะห์)	UNIVAR, Australia
5. สารละลายฟอร์มอลดีไฮด์, 38 % (w/w) (เกรดวิเคราะห์)	BHD, England
6. เอทานอล, 99.9 % (w/w) (เกรด HPLC)	BHD, England
7. โพรพานอล, 99.9 % (w/w) (เกรด HPLC)	BHD, England
8. ยีสต์เอ็กซ์แทร๊กท์	HIMEDIA, India
9. มอลต์เอ็กซ์แทร๊กท์	HIMEDIA, India
10. เปปโตน	HIMEDIA, India
11. กลูโคส	Sigma, USA

3.3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

รายการ	**รุ่น และบริษัทผู้ผลิต**
1. เครื่อง GC (Gas Chromatography)	GC-14B, Shimadzu, Japan
2. เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)	LC-10 AD Shimadzu, Japan
3. Vortex Mixer	G 560 E, Scientific Ins., New York, USA
4. ตู้อบไอร้อน (Hot air oven)	F 240 WTE Binder, Germany

5. เครื่องชั่งละเอียด (Balance) 2 ตำแหน่ง	BP3100S, Sartorius, Germany
6. เครื่องชั่งละเอียด (Balance) 4 ตำแหน่ง	BP221S, Sartorius, Germany
7. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	UB5, Denver, Thailand
8. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)	UM 65LVA, Thailand
9. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand refractometer)	Atago, Japan
10. Microscope	Olympus Optical Co, Japan
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	RC 28 S, Sorvall ,USA
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)	U 32, Boeco, Germany
13. Spectrophotometer	UV-1201, Shimadzu, Japan
14. สไลด์นับเซลล์ (Haemacytometer)	Improved Neubauer Bright line, Boeco, West Germany
16. เครื่อง Laminar air flow	BH 143, Gelman Sciences, Australia
17. ถังหมัก (Fermenter)	Biostat B, B. Braun Biotech International, Germany
18. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิได้ (Controller incubator)	Innova 4300, New Brunswick, Canada
19. Magnetic stirrer	Panapolytech, Thailand
20. Autopipette	Grilson, France
21. คิวเวต (cuvette)	แบบควอตซ์ (quartz), Hellma, Austraria

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

เตรียมวัตถุดิบน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยเก็บเกี่ยวข้าวฟ่างหวานพันธุ์ KKU 40 อายุประมาณ 100 - 120 วัน จากนั้นคั้นน้ำหวานออกจากลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วยเครื่องหีบสกัด นำน้ำหวานที่คั้นได้ไปเคี่ยวให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดประมาณ 75 องศาบริกซ์ น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานเข้มข้นที่ได้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

3.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานหลังเคี่ยวจากข้อ 3.4.1 นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทาง

เคมีเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (โดยใช้ Hand-held refractometer) (George, 2008) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (โดย Phenol sulfuric method) (Ebell, 1969) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (โดยวิธี 3,5 Dinitrosalicylic acid method) (Ebell, 1969) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส (โดยวิธี HPLC) (ดัดแปลงจาก Laopaiboon และคณะ, 2007) ปริมาณ Fermentable nitrogen (โดยวิธี Formol tritration) (Gump และคณะ, 2002) และความเป็นกรดด่าง (โดย pH meter) เป็นต้น

3.4.3 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมัก

นำน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานเข้มข้นจากข้อ 3.4.1 มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเป็น 280 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ก่อนนำไปใช้ในการหมัก

3.4.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01

นำกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 จำนวน 1-2 loopfull จากอาหารอาหารแข็ง YM (YM agar) ถ่ายลงในอาหารเหลว YM โดยอาหารเหลว YM 1 ลิตร ประกอบด้วยยีสต์เอ็กซ์แทร๊กท์ 3.0 กรัม มอลท์เอ็กซ์แทร๊กท์3.0 กรัม เปปโทน 5.0 กรัม และกลูโคส 10.0 กรัม นำอาหารอาหารเหลว YM ที่มีกล้าเชื้อยีสต์ไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 - 18 ชั่วโมง

3.4.5 การศึกษาเบื้องต้น (preliminary studies)

3.4.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01

นำกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 (จากข้อ 3.4.4) ปริมาตรร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ถ่ายลงในน้ำคั้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 150 กรัมต่อลิตร ที่มีและไม่มีการเติมยีสต์เอ็กซ์แทร๊กท์ 9 กรัมต่อลิตร (Laopaiboon *et al*, 2009) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระหว่างการทดลองเก็บตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนยีสต์ที่มีชีวิต โดย Direct counting method และย้อมด้วยเมททิลีนบลู (methylene blue) (Zoecklien และคณะ, 1995)

3.4.5.2 การหาระดับในแต่ละปัจจัยที่มีความเหมาะสมก่อนนำไปใช้ในการแปรผันโดยวิธี Orthogonal หรือ Response Surface Methodology (RSM)

กำหนดจำนวนและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาผลของการกวน การให้อากาศ และระยะเวลาในการให้อากาศต่อการเจริญของยีสต์ เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ซึ่งตัวแปรเหล่านี้หาได้จากการตรวจเอกสาร (บทที่ 2) ในหัวข้อการให้อากาศมีผลต่อการผลิตเอทานอลและสรีระวิทยาของยีสต์ โดยให้อัตราการกวนที่ศึกษาเป็น 100, 150 และ 200

รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5, 1.5 และ 2.5 vvm และเวลาในการให้อากาศเป็น 2, 4 และ 6 ชั่วโมง (Delgenes และคณะ, 1986; Groleau และคณะ, 1995; Alfenore และคณะ, 2004; Bai และคณะ, 2004; Limtong และคณะ, 2007; Pham and Wright, 2008; Liu and Shen, 2008; Dodic และคณะ, 2009; Emily และคณะ, 2009; Seo และคณะ, 2009) จากนั้นเลือกช่วงที่เหมาะสมเพื่อดูความแตกต่างของระดับที่ใช้ในการศึกษาในแต่ละปัจจัยก่อนนำไปใช้ในข้อ 3.4.6 โดยทดลองในสภาวะที่มีค่าสูงสุด (อัตราการกวน 200 rpm มีการให้อากาศ 2.5 vvm เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง) และค่าต่ำสุด (อัตราการกวน 100 rpm มีการให้อากาศ 0.5 vvm เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง) ในระดับของแต่ละปัจจัย เปรียบเทียบกับสภาวะควบคุม (อัตราการกวน 100 และ 200 rpm ไม่มีการให้อากาศ ตามลำดับ) โดยในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ ความเป็นกรดด่างโดย pH meter ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักด้วย DO_2 electrode ปริมาณของแข็งละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulphuric acid ปริมาณเอทานอล โดยใช้ Gas chromatography (ดัดแปลงจาก Laopaiboon และคณะ, 2007) และจำนวนยีสต์ที่มีชีวิต โดย Direct count method และย้อมด้วยเมททิลีนบลู พร้อมทั้งวัดขนาดของเซลล์

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ได้จากแต่ละสภาวะในแง่ของความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ ผลได้ และอัตราผลผลิตของเอทานอล เมื่อ

ผลได้เอทานอล (กรัมต่อกรัม) = ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)

อัตราผลผลิตของเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) = ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)

3.4.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่มีการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี Orthogonal

3.4.6.1 การผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน (ข้อ 3.4.3) ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP 01 เริ่มต้น 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (จากการทดลองข้อ 3.4.5.1) เมื่อเริ่มต้นระบบการผลิตเอทานอลจะมีการแปรผันอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และเวลาในการให้อากาศตามผลการศึกษาเบื้องต้น (ข้อ 3.4.5) จากนั้นหยุดการให้อากาศและหมักต่อจนกว่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมักมีค่าคงที่ ในระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.4.5.2

3.4.6.2 คำนวณและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่สภาวะต่างๆ โดยพิจารณาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ได้จากแต่ละสภาวะในแง่ของความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ ผลได้ และอัตราผลผลิตของเอทานอลตามข้อ 3.4.5.2

3.4.6.3 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธี Orthogonal และลำดับอิทธิพลของแต่ละปัจจัย (order of influence) ที่ใช้ในการศึกษาจากวิธี Orthogonal พร้อมเปรียบเทียบผลที่ได้ของทั้ง 2 วิธี

3.4.6.4 การทวนสอบผลการทดลอง (verification experiment) ซึ่งได้จากสภาวะที่เหมาะสมในข้อ 3.4.6.3

ผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NP01 เริ่มต้น 2.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้นระบบการผลิตเอทานอลจะมีการควบคุมอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และเวลาในการให้อากาศ ในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.6.3 จากนั้นเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ตามข้อ 3.4.5.2