

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ และวัตถุดิบ

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเหลว YM (yeast extract malt extract broth) อาหารเหลว YM 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 3.0 กรัม malt extract 3.0 กรัม peptone 5.0 กรัม และ glucose 10.0 กรัม

2) อาหารแข็ง YM (YM agar) สูตรอาหารแข็ง YM เหมือนสูตรอาหารเหลว YM แต่เพิ่ม agar 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3) อาหารน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน อาหารประกอบด้วยน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร

3.1.2 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมักเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองคือ น้ำหวานที่คั้นได้จากลำต้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์ มข. 40 จากสาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 16.6 องศาบริกซ์ จากนั้นเติมน้ำตาลทรายให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 280 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 28 นาที ก่อนนำไปใช้ในการหมักเอทานอล

3.2 จุลินทรีย์ การเตรียมกล้าเชื้อ และสารอาหารเสริม

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

S. cerevisiae NP 01 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.ไพบุลย์ ด้านวิรุฑย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (YM broth) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงบนอาหาร YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมักต่อไป

3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar slant 1 หลูป ถ่ายลงในอาหาร YM broth และนำไปเลี้ยงในตู้บ่มแบบเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานและนำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

3.2.3 สารอาหารเสริม

สารอาหารเสริมที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

- 1) Yeast extract (Himedia laboratory, India)
- 2) กากเซลล์ยีสต์ หรือ dried spent yeast (Beerthip Brewery (1991) Co., Ltd. Bang Baan, Phra Nakhon Sri Ayutthaya, Thailand)

- 3) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (analytical grade, BDH)
- 4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (analytical grade, BDH)
- 5) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (analytical grade, BDH)

3.3 วัสดุอุปกรณ์

3.3.1 สารเคมี

- 1) ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (analytical grade, Panreac)
- 2) กรดซัลฟูริกเข้มข้น 97-99 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (analytical grade, Merck)
- 3) โพรพานอล 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) (analytical grade, BDH)
- 4) เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) (analytical grade, BDH)
- 5) กลูโคส (D-glucose) (Utopian, Thailand)
- 6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 และ 1 นอร์มอล (analytical grade, BDH)
- 7) ไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล (analytical grade, BDH)
- 8) ฟอर्मอลดีไฮด์ 39 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (analytical grade, BDH)
- 9) กลีเซอรอล (analytical grade, Sigma)
- 10) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (analytical grade, BDH)
- 11) KH_2PO_4 (analytical grade, BDH)
- 12) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (analytical grade, BDH)
- 13) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (analytical grade, BDH)
- 14) Sucrose (Mitrphol, Thailand)

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

- 1) Hand refractometer (Atago, Japan)
- 2) Hemacytometer (Bright-Line deep 1/10 mm., Baeco, Germany)
- 3) Laminar air flow chamber (BH 143, Gelman Sciences, Australia)
- 4) Spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Co., Japan)
- 5) pH meter (pH / ATC electrode, Sartorius, Germany)
- 6) Gas chromatography (GC 14B, Shimadzu Co., Japan)
- 7) High performance liquid chromatography (HPLC-10 AD, Shimadzu Co., Japan)
- 8) Autoclave (UM-65 L VA, United mechanical, Thailand)
- 9) Microscope (Olympus Optical Co., Japan)
- 10) Incubator shaker (G 10 Gyrotory, New Brunswick Scientific Edison, USA)
- 11) Incubator chamber (78532, WTB binder, Germany)
- 12) Balance (BP 221S และ BP 3100S, Sartorius, Germany)
- 13) Centrifuge (Super T 21, Sorvall)
- 14) Vortex mixer (G 560E, Scientific Industry, USA)

15) Magnetic stirrer (KMO 2 B, IKA-Werke, Germany)

16) Micro centrifuge (Spectrafuge 16M, Labnet, Lio Lab, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การวิเคราะห์ประกอบน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน ยีสต์เอ็กซ์แทรคและกากเซลล์ยีสต์

นำน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน yeast extract และกากเซลล์ยีสต์มาวิเคราะห์ดังนี้ พีเอช โดยใช้ พีเอชมิเตอร์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นองศาบริกซ์โดย Hand refractometer (ภาคผนวกที่ 1) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (ภาคผนวกที่ 2) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS (ภาคผนวกที่ 3) ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส กลูโคสและซูโครส โดย High performance liquid chromatography (ดัดแปลงจาก Sesta, 2006) ปริมาณแร่ธาตุหลักอื่นๆ วิเคราะห์โดยบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd.) จังหวัดขอนแก่น

3.4.2 การผลิตเอทานอลแบบกะโดยใช้อาหารสังเคราะห์มาตรฐานสูตรผลิตเอทานอล

3.4.2.1 เตรียมน้ำหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์สูตรผลิตเอทานอล (ดัดแปลงจาก Melzoch, 1994) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตรผลิตเอทานอล

องค์ประกอบ	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
Sucrose	280.0

น้ำหมักปริมาตร 400 มิลลิลิตร ถ่ายลงในฟลาสก์ที่ป้องกันอากาศเข้า หรือฟลาสก์แอร์ ล็อก (air-locked flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร (ดังรูปที่ 3.1) และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 28 นาที

3.4.2.2 เตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 (ข้อ 3.2.2) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ถ่ายลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ปลอดเชื้อในข้อ 3.4.2.1 โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^7 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.2.3 นำฟลาสก์ในข้อ 3.4.2.2 ไปบ่มโดยมีอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 48, 56 และ 72 ชั่วโมง เพื่อ วิเคราะห์ พีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดย hand refractometer ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก ปริมาณเอทานอล โดย Gas Chromatography (ภาคผนวกที่ 4) และปริมาณเซลล์ ยีสต์ที่รอดชีวิตในน้ำหมัก โดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วยเมทิลีนบลู และนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ Haemocytometer (ภาคผนวกที่ 5)

3.4.2.4 คำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ (yield) และอัตราผลผลิต (productivity) เอทานอล โดย

$$\begin{aligned} \text{ผลได้} &= \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}} \\ \text{อัตราผลผลิต} &= \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)}} \end{aligned}$$



รูปที่ 3.1 การผลิตเอทานอลแบบกะในพลาสติกแอร์ล็อกขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.3 การผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยไม่เติมสารอาหารเสริม

3.4.3.1 เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อดังข้อ 3.1.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในพลาสติกที่ป้องกันอากาศเข้า หรือพลาสติกแอร์ล็อก (air-locked flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร (ดังรูปที่ 3.1)

3.4.3.2 เตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 (ข้อ 3.2.2) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ถ่ายลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ปลอดเชื้อในข้อ 3.4.3.1 โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.3.3 นำพลาสติกในข้อ 3.4.3.2 ไปปั่นโดยมีอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 48, 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.3 และคำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอล เช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.2.4

3.4.4 การผลิตเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยการเติมสารอาหารเสริม

3.4.4.1 เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อดังข้อ 3.1.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในพลาสติกแอร์ล็อกขนาด 500 มิลลิลิตร โดยเติมสารอาหารที่สภาวะต่างๆ ดังตารางที่ 3.2 น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่เติมสารอาหารใช้เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของสารอาหารเสริม

สภาวะ	องค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)
ชุดควบคุม	ไม่เติมสารอาหาร
DSY*	กากเซลล์ยีสต์ 13.34 (มีไนโตรเจนเท่ากับยีสต์เอ็กซ์แทรก 9 กรัมต่อลิตร)
YeMe**	ยีสต์เอ็กซ์แทรก 9, สังกะสี 0.01, แมกนีเซียม 0.05 และ แร่ฟอสฟอรัส 0.04
DSYMe***	กากเซลล์ยีสต์ 13.34, สังกะสี 0.01, แมกนีเซียม 0.05 และ แร่ฟอสฟอรัส 0.04

หมายเหตุ : * กากเซลล์ยีสต์

** ยีสต์เอ็กซ์แทรกพร้อมกับโลหะโดยความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุด (Khongsay และคณะ, 2012 และ Nuanpeng และคณะ, 2011, Deesuth และคณะ, 2012)

*** กากเซลล์ยีสต์ร่วมกับโลหะ

3.4.4.2 เตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* NP 01 (ข้อ 3.2.2) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ที่ได้ถ่ายลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ปลอดเชื้อในข้อ 3.4.4.1 โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.4.3 นำฟลาสก์ในข้อ 3.4.4.2 ไปบ่มโดยมีอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 48, 60 และ 72 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ดังข้อ 3.4.2.3 และคำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอล