บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์การทดลอง

รายการวัสดุอุปกรณ์หลักๆ ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สรุปได้ดังตาราง

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV – 1601 UV – 2501	Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter)	PHM 210	Radiometer Copenhegen, France
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)	Hiclave HV – 85	Hirayama, Japan
4. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (Fermenter)	Biostat – B	B. Braun Biotech International, Germany
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	G560E	Scientific industries, USA
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (Centrifuge)	Sorvall RC – 26 PLUS	Dupont, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น (Microcentrifuge)	SIGMA 1 K 15	SIGMA Laboratory centrifuge, USA
8. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	PR 530 Delta Range	Mettler – Toledo, Germany
9. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)		Europeene, R.D. Flufrance
10. ตู้อบ (Hot air oven)	FD240	WTC Binder, Germany
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) 11.1 คอลัมน์ 11.2 เครื่องประมวลผล	GC 14B 20% PEG-20M C-R7 Ae plus Chromatopac	Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan
12. รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand-Held refractometer)	N-1	Atago
13. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	LC- 10 AD	Shimadzu, Japan

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

รายการสารเคมีที่สำคัญสำหรับการทดลองในครั้งนี้ สรุปได้ดังตาราง

ชื่อสารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. กรดซัลฟิวริก (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
2. กรดไฮโดรคลอริก (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
3. กลูโคส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERK, Germany
5. ซูโครส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
6. ฟรุคโตส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
7. เอทานอล (เกรดสำหรับ GC หรือ HPLC)	MERK, Germany
8. ฟีนอลซัลฟิวริก	MERK, Germany
9. โซเดียมคาร์บอเนต	MERK, Germany
10. โปแตสเซียมเมทตะไบซัลไฟด์	MERK, Germany
11. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	MERK, Germany
12. yeast extract	BDH, England
13. malt extract	BDH, England
14. peptone	BDH, England

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์คืออาหารสูตร Yeast extract-Malt extract-medium (YM) (3% glucose) ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังนี้

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

เตรียมโดยการละลายส่วนผสมรวมกันในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้นผง (agar) 20 กรัม ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที

3.4 วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์

เก็บรักษาเชื้อยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKUY-53 บนอาหารเอียงแข็ง (slant agar) สูตร YM โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารแข็งใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.5 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลและการวิเคราะห์องค์ประกอบในวัตถุดิบ

เก็บเกี่ยวลำต้นข้าวฟ่างหวานเมื่อมีอายุประมาณ 100-140 วันหลังปลูก จากนั้นนำมาบีบสกัดน้ำหวานโดยใช้เครื่องหีบ (โดยขอความอนุเคราะห์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ทำการเก็บรวบรวมน้ำหวานที่ได้จากการบีบสกัดไว้ในขวดพลาสติกขนาด 5 ลิตร จากนั้นแบ่งน้ำหวานส่วนหนึ่งไป

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป โดยการวิเคราะห์ทางเคมีประกอบไปด้วย

1. pH โดยใช้ pH meter
2. ความหวาน โดยใช้ hand refractometer
3. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี phenol-sulfuric
4. ปริมาณแร่ธาตุบางชนิด โดยใช้เครื่อง atomic absorption (AA)

3.6 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญและผลิตเอทานอล

เขี่ยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* BDKKUY-53 เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่ โดยใช้กล้าเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และนำไปบ่มที่สภาวะเช่นเดิม จนกระทั่งเซลล์ยีสต์มีจำนวนเริ่มต้นประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจนับด้วย haemacytometer นำเซลล์ที่ได้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3.7 วิธีการทดลอง

3.7.1 การศึกษารูปแบบการเจริญและอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในอาหารสูตรสมบูรณ์ (YM medium) และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium)

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* DBKKU-53 ลงในอาหารสูตร YM จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องบ่มเขย่า (incubator shaker) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่โดยให้มีเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อจนกระทั่งเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (log phase) จึงทำการถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเหลวสูตร YM และอาหารสูตรผลิตเอทานอล (EP medium) ซึ่งมีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะนิ่ง (static culture) โดยแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วย haemacytometer และวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี phenol-sulfuric และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าอัตราการเจริญสูงสุด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการทดลองต่อไป

3.7.2 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

3.7.2.1 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

ในการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในครั้งนี้ ใช้แผนการทดลองทางสถิติมาช่วยในการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยในขั้นต้นจะคัดเลือกปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้แผนการทดลองที่เรียกว่า Plackett-Burman design ซึ่งปัจจัยที่ทำการคัดเลือก และระดับของปัจจัยแต่ละปัจจัยสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสของปัจจัย และระดับของแต่ละปัจจัยสำหรับใช้ในการคัดเลือกด้วยแผนการทดลอง Plackette-Burman design

codes	Factors	units	Low level (-1)	High level (+1)
A	Sugar concentration	g L^{-1}	180	250
B	pH		4.5	5.5
C	Cell concentration	Cells mL^{-1}	1×10^{6}	1×10^{8}
D	NH_4NO_3	g L^{-1}	0.00	1.5
E	urea	g L^{-1}	0.00	1.5
F	Yeast extract	g L^{-1}	0.00	9.0
G	DAP	g L^{-1}	0.00	1.5
H	$MgSO_4.7H_2O$	g L^{-1}	0.5	3.0

ในขั้นตอนของการทดลองหมักเพื่อผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะปัจจัยต่างๆ นั้น ทำการทดลองในฟลาส์กขนาก 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารสูตรผลิตเอทานอลที่มีน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบ โดยปรับองค์ประกอบของอาหารตามภาวะปัจจัยแต่ละระดับ จากนั้นบรรจุอาหารปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดฟลาส์กสด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นลงไปโดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นตามแผนการทดลอง และปิดฟลาสก์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปใน air lock นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol – sulphuric
- การเจริญของเซลล์ด้วยวิธี haemacytometer
- ค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วย pH meter
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography

3.7.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53

หลังจากทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลตามผลการทดลองในข้อ 3.7.2.1 นำปัจจัยเหล่านั้นมาศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองที่เรียกว่า central composite design (CCD) ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง response surface methodology (RSM) ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษารวมทั้งระดับของแต่ละปัจจัยภายหลังจากการวิเคราะห์ทางสถิติ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 รหัสของปัจจัย และระดับของแต่ละปัจจัยสำหรับใช้ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลองแบบ central composite design

			Levels				
codes	Factors	units	-1.68	-1	0	+1	+1.68

A	Cell concentration	cells mL^{-1}	5.00×10^{6}	2.43×10^{7}	5.25×10^{7}	8.07×10^{7}	1.00×10^{8}
B	Sugar concentration	g L^{-1}	180	204	240	276	300
C	Yeast extract	g L^{-1}	3	4.8	7.5	10.2	12

หลังจากทราบระดับของปัจจัยที่เหมาะสมแล้ว จะทำการทดลองหมักเพื่อทวนสอบความเหมาะสมของระดับของปัจจัยตามแผนการทดลอง ซึ่งวิธีการทดสอบจะทำการทดลองหมักในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน โดยขั้นตอนและวิธีการหมักจะดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.7.2.2 และในระหว่างการหมักจะสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol – sulphuric
- การเจริญของเซลล์ด้วยวิธี haemacytometer
- ค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วย pH meter
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography

3.7.2.3 การทดสอบการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

นำสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองข้างต้นไปใช้ในการทดสอบการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *S. cerevisiae* DBKKU-53 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยกำหนดปริมาตรเริ่มต้นในการทำงาน (working volume) เท่ากับ 1.5 ลิตร ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักโดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ และนำไปวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ดังนี้

- ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol – sulphuric
- การเจริญของเซลล์ด้วยวิธี haemacytometer
- ค่าความเป็นกรด – ด่าง ด้วย pH meter
- ปริมาณของเอทานอลด้วย Gas chromatography

3.8 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.8.1 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานก่อนหมัก และตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปหยดบนกระจกของเครื่อง hand refractometer ที่ทำการปรับค่าแล้วด้วยน้ำกลั่น จากนั้นอ่านค่าความหวานที่ได้ และบันทึกข้อมูล

3.8.2 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานก่อนหมัก และน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาประมาณน้ำตาล

ทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric ตามวิธีการของ Taylor (1995) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์

3.8.3 การหาความเข้มข้นของเอทานอล

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที และดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC โดยใช้ คอลัมน์ชนิด 20%PEG-20N ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ฉีดเข้าคอลัมน์ 1 ไมโครลิตร ใช้แก๊สไนโตรเจนเหลวเป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) ควบคุมอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ คอลัมน์และตัวตรวจวัด ที่ 180, 150 และ 250 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ตัวตรวจวัดแบบ TCD (thermal conductivity detector)

3.8.4 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างไปหยดบนแผ่นสไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำแผ่นสไลด์นับเซลล์ไปวางใต้กล้องจุลทรรศน์ และตรวจนับจำนวนเซลล์ในแต่ละช่อง และคำนวณจำนวนเซลล์ที่นับได้ต่อไป

3.8.5 การวัดค่า pH

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จากนั้นนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และบันทึกค่า pH ที่ได้

3.8.6 การคำนวณประสิทธิภาพในการหมักเอทานอล

คำนวณประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปของผลได้เอทานอลและอัตราผลผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ผลได้ (Yield)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

$$\text{อัตราผลผลิต (Productivity)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในรูปของความเข้มข้นของเอทานอล อัตราผลผลิตเอทานอล และผลได้ของเอทานอลที่สภาวะต่างๆ ของการทดลอง