วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุดิบในการศึกษาวิจัยนี้เป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ ข้าวกล้วยทั้งผล เปลือกกล้วย และกากมันสำปะหลัง โดยนำมาตากให้แห้งและบดด้วย hammer mill ให้มีขนาดเล็กลง และทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในขวดโหลกันความชื้น

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้แก่ ยีสต์ปกติ *Saccharomyces cerevisiae* 5048 และ *Saccharomyces cerevisiae* 5049 และเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* 5547 และ *Saccharomycopsis fibuligera* 2321 โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ผลิตผลทางการเกษตร 1.5-30กรัม/ลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 2กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 0.5กรัม/ลิตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1กรัม/ลิตร และ ยีสต์สกัด 1 กรัม/ลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์จากนั้นนำมาทำลายเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

การศึกษาสูตรอาหารและเชื้อยีสต์ที่ใช้น้ำตาลเฮกโซสในการผลิตเอทานอล

นำเชื้อยีสต์ปกติ *Saccharomyces cerevisiae* 5048 และ *Saccharomyces cerevisiae* 5049 และเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* 5547 และ *Saccharomycopsis fibuligera* 2321 เลี้ยงในสูตรอาหารที่ 1 และ 2 โดยมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบและศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 2 สูตรอาหารสำหรับการหมักเอทานอล 2 สูตร

ส่วนประกอบ	สูตรที่ 1 (กรัม/ลิตร)	สูตรที่ 2 (กรัม/ลิตร)
น้ำตาล	20	20
$(NH_4)_2SO_4$	1	2
KH_2PO_4	1	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5	1
Yeast extract	4	1

ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

การหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตรด้วยน้ำตาลกลูโคส

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นลงในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud medium ชนิดเหลวอยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อขวดประมาณ 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงอาหารทั้ง 2 สูตรที่มี

น้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลและเอทานอล

การศึกษาการหมักผลผลิตทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อการผลิตเอทานอล

1. เตรียมสารละลายของผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักลงใน ขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปรับสภาพและทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. จากนั้นเติมเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์แต่ละสายพันธุ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า

3. เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิคแก๊ซโครมาโตกราฟี และวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เทคนิค HPLC

การศึกษาผลของปริมาณผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในขั้นตอนเดียว

1. เตรียมสารละลายผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักลงในขวดทดลอง ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปัจจัยที่ศึกษาที่ ความเข้มข้นสารละลายผลิตผลทางการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก 0.15 - 3.00 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปรับพีเอชและทำให้ปลอดเชื้อโดยการอบด้วยไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. จากนั้นใส่เชื้ออะไมโลไลติคยีสต์แต่ละสายพันธุ์ และอาหาร ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า

3. เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิค แก๊ซโครมาโตกราฟี และวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เทคนิค HPLC

การศึกษาปริมาณเอทานอล โดยการหมักแบบ separate hydrolysis and fermentation (SHF) ด้วยเชื้อยีสต์ปกติ และเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

1. การพรีทรีตเมนต์กากมันสำปะหลังและทำให้เป็นน้ำตาลโดยใช้กากมันสำปะหลัง 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละ ลายในสารละลาย กรดซัลฟูริคความเข้มข้น 0.1 โมลาร์และการ autoclave ที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอช 5.5 เติมเอนไซม์ อะไมโลกลูโคซิเดส เพคติเนส แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 24 ชม.

2. นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

3. นำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำน้ำหมักไปกรอง

4. จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ และเพิ่มอาหาร (สูตรที่ 2) ลงไป ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 50 รอบ/นาที

5. เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิค แก๊ซโครมาโตกราฟี และน้ำหนักเซลล์

การศึกษาปริมาณเอทานอล โดยการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ด้วยเชื้อยีสต์ปกติ และเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

1. ปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยใช้ กรดซัลฟูริคความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ร่วมกับการ autoclave ที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอช 5.5 เติมเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส เพคติเนส เซลลูเลส และเฮมิเซลลูเลส พร้อมเชื้อยีสต์ และเพิ่มอาหาร (สูตรที่ 2) ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 50 รอบ/นาที โดยไม่เติมเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดสในการบ่มเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

2. เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิค แก๊ซโครมาโตกราฟี และน้ำหนักเซลล์

การศึกษาการเจริญและผลผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์อะไมโลไลติคยีสต์

นำเชื้อยีสต์อะไมโลไลติคยีสต์ *S. diastaticus* 5547 เลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะดังแสดงในตารางที่ 2 ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อฆ่าเชื้อด้วยเครื่องอบแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที และเพาะเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอล

การศึกษาการพรีทรีเมนต์ต่อผลผลิตเอทานอล โดยการหมักด้วยอะไมโลไลติคยีสต์

1. การพรีทรีตเมนต์กากมันสำปะหลังโดยใช้กากมันสำปะหลัง 1.5-3 เปอร์เซ็นต์แบ่งออกเป็น

   ก. โดยไอน้ำอย่างเดียว

   ข. โดยสารละลายด่าง 0.025 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการอบด้วยไอน้ำ

   ค. โดยสารละลายกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ร่วมกับการอบด้วยไอน้ำ

2. จากนั้นปรับพีเอชเป็น 5.5

3. เติมสารอาหาร โดยปริมาตรสารอาหารแบ่งเป็น 3 ปริมาตร ได้แก่ 100 มิลลิลิตร 5 ลิตร และ 70 ลิตร

4. เติมเชื้อยีสต์ และเพิ่มสารอาหาร นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที

5. เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิค แก๊สโครมาโตกราฟี และน้ำหนักชีวมวล

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวบดโดยเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

1. เตรียมเมล็ดข้าวบด ความเข้มข้น 0.125 -3.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร 5 ลิตร และ 70 ลิตร ปรับสภาพโดยใช้ กรดซัลฟูริคความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ร่วมกับการอบด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับพีเอช 5.5 เติมเชื้อยีสต์ และเพิ่มอาหารลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที โดยไม่เติมเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดสในการบ่มเลี้ยงเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

2. เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิค แก๊ซโครมาโตกราฟี และน้ำหนักเซลล์

การศึกษาผลผลิตเอทานอลจากกล้วยน้ำว้าโดยการหมักด้วยเชื้ออะไมโลไลติคยีสต์

1. การพรีทรีตเมนต์เปลือกกล้วย ผลกล้วย และกล้วยน้ำว้าทั้งผลโดยใช้ความเข้มข้น 1.5-3 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกเป็น

ก. โดยไอน้ำอย่างเดียว

ข. โดยสารละลายด่าง 0.025 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการอบด้วยไอน้ำ

ค. โดยสารละลายกรดซัลฟูริก 0.1 โมลาร์ร่วมกับการอบด้วยไอน้ำ

2. จากนั้นปรับพีเอชเป็น 5.5

3. เติมสารอาหาร โดยปริมาตรสารอาหารแบ่งเป็น 3 ปริมาตร ได้แก่ 100 มิลลิลิตร 5 ลิตร และ 70 ลิตร

4. เติมเชื้อยีสต์ และเพิ่มสารอาหาร นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า 50 รอบต่อนาที

5. เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี และน้ำหนักชีวมวล