บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์การเตรียมเชื้อตั้งต้น

1.1 ยีสต์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* V1116

1.2 แบคทีเรีย สายพันธุ์ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract malt extract broth และ Yeast extract malt extract agar (ภาคผนวก ก)

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Zymomonas* medium (ภาคผนวก ก)

1.5 ตะไบสำหรับเลื่อยแก้ว

1.6 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

1.7 หลอดทดลองขนาด 15 ml (test tube)

1.8 ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อฝาดำขนาด 15 ml

1.9 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

1.10 Parafilm

1.11 กลีเซอรอล (glycerol)

1.12 ตู้บ่มเชื้อ (BINDER)

1.13 หม้อนึ่งอัดไอ (TOMY SS-325)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย

2.1 ตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้จากบริษัทผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง (เชียงใหม่) จำกัด

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient gar (NA) (ภาคผนวก ก)

2.3 1.0 M hydrochloric acid (ภาคผนวก ข)

2.4 1.0 M sodiumhydroxide (ภาคผนวก ข)

2.5 Mac Farland Standard No. 10 (ภาคผนวก ค)

2.6 น้ำตาลกลูโคส

2.7 Potassium metabisulfite (KMS)

2.8 น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายมิตรผล)

2.9 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 150, 250, 500 และ 1,000 ml

2.10 ขวด Duran ขนาด 500 และ 1,000 ml

2.11 ขวดเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขนาด 2.5 l

2.12 ถังเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขนาด 200 l

2.13 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 และ 100 ml

2.14 หลอดทดลองขนาด 15 ml (test tube)

2.15 กระบอกตวง 100, 500 และ 1,000 ml

2.16 ปิเปตขนาด 1 และ 10 ml

2.17 Micropipette ขนาด 20 µl, 1,000 µl และ 10 ml

2.18 Micropipette tip ขนาด 20 µl, 1,000 µl และ 10 ml

2.19 ห่วงถ่ายเชื้อ

2.20 Shaking incubator (JESICO model J-MPI)

2.21 หม้อนึ่งอัดไอ (TOMY SS-325)

2.22 ตู้อบฆ่าเชื้อ Type 420 (HERAEMO)

2.23 เครื่องวัด pH (Metrohm)

2.24 เครื่องกวนสารละลาย (Heidolph MR 2002)

2.25 Spreader

2.26 Ethyl alcohol 95%

3. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการผลิตเอทานอล

3.1 Ebulliometer (ภาคผนวก ง)

3.2 Pocket refractometer (ATAGO) (ภาคผนวก ง)

3.3 เครื่องกลั่นชนิดหม้อต้มขนาด 2 ลิตร (ภาคผนวก ง)

4. อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาค่า BOD

4.1 ขวด BOD ขนาด 300 ml และจุกแก้ว

4.2 บิวเรตขนาด 50 ml

4.3 ปิเปตขนาด 10 ml

4.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml

4.5 ปั๊มสุญญากาศ (suction pump)

4.6 สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

4.7 สารละลาย alkali-iodine-azide (AIA)

4.8 สารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น (H_2SO_4 conc.)

4.9 น้ำแป้ง

4.10 สารละลานมาตราฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.025 M ($Na_2S_2O_3$)

4.11 ตู้เย็นที่ควบคุมอุหภูมิ 20°C (Refrigerated Incubator)

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาปริมาณ Total protein โดยวิธี Bradford Kit (BIO-RAD)

5.1 Bradford Reagent

5.2 จานหลุม 96 หลุม (96 wells plate)

5.3 Absorbance microplate reader

5.4 Micropipette ขนาด 200 µl

5.5 Micropipette tip ขนาด 200 µl

วิธีการวิจัย

1. การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสและเติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v)

1.1 เก็บตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้

น้ำเวย์เต้าหู้จากโรงงานคุณประเสริฐอุตสาหกรรมอาหาร อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ ในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง สิงหาคม พ.ศ. 2552-2553 โดยเก็บลงในถังพลาสติกขนาด 20 l ปิดฝาและเก็บไว้ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °C

1.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้นขยายขนาดปริมาณเชื้อตั้งต้น

1.2.1 การเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* V1116 จากอาหารวุ้นเอียง และขยายขนาดปริมาณเชื้อตั้งต้น

นำ *S. cerevisiae* V1116 ที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงบนอาหาร YM broth บ่มบนเครื่องเขย่าอุณหภูมิ 25°C ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร YM Agar บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อยีสต์ที่ได้ลงอาหารวุ้นเอียงและทำการ subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 150 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมน้ำตาลซูโครส 10% (w/v) ของปริมาณน้ำเวย์เต้าหู้ แล้วปรับ pH 4.5 โดยใช้ 1.0 M HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งน้ำเวย์ไว้ให้เย็น เพาะเชื้อที่เจริญในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml ที่มีเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15 ml เขย่าให้เชื้อกระจายทั่ว นำไปเทียบกับ Mc Farland Standard No. 10 (ภาคผนวกตาราง 1) นำไปบ่มบน Shaking incubator ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2. การเพาะเลี้ยง *Zymomonas* sp. TISTR 1102 จากหลอดเชื้อแห้งแข็งและขยายขนาดปริมาณเชื้อตั้งต้น (ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, 2551)

นำผ้ากอซชุบแอลกอฮอล์ 70% ให้พอหมาด เช็ดบริเวณรอบๆ ampule ที่บรรจุแบคทีเรียจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และใช้ตะไบสำหรับเลื่อยแก้วเลื่อยลงบริเวณกึ่งกลางสำลีให้เป็นรอยลึกลงไปในเนื้อแก้วใช้ผ้ากอซที่มีความหนาพอประมาณชุบแอลกอฮอล์ 70% ให้พอหมาด หุ้มหลอดบรรจุแบคทีเรีย จากนั้นหักบริเวณที่ใช้ตะไบเลื่อยไว้ ซึ่งจะใช้ สองมือจับผ้ากอซที่หุ้มหลอดบรรจุแบคทีเรียไว้และใช้หัวแม่มือกดเบาๆบริเวณรอยตะไบ ดึงปลายหลอดและสำลีทิ้งลงในน้ำยาฆ่าเชื้อ ใช้ Pasture pipette ดูดอาหารเหลว *Zymomonas* medium ปริมาณ 0.3-0.4 ml ถ่ายลงในหลอดอาหารเพื่อทำเป็น cell suspension ใช้ Pasture pipette ดูด cell suspension 1 หยดลงบนจานอาหาร *Zymomonas* medium ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ ส่วน cell suspension ที่เหลือให้ไปนำไปถ่ายลงในอาหารเหลว *Zymomonas* medium ปริมาตร 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน เก็บเชื้อที่ได้เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง เก็บ Stock culture ในขวดอาหารเอียงปิดผาขวดด้วย parafilm และเก็บใน glycerol 40% โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับในขวดอาหารเอียงทำการ subculture ทุกๆ 2 สัปดาห์

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 150 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมน้ำตาลซูโครส 10% (w/v) ของปริมาตรน้ำเวย์เต้าหู้ ปรับ pH 7 โดยใช้ 1.0 M NaOH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งน้ำเวย์ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเพาะเชื้อที่เจริญในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml ที่มีเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15 ml เขย่าให้เชื้อกระจายทั่ว นำไปเทียบกับ Mc Farland Standard No. 10 (ภาคผนวกตาราง 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน

1.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* V1116 และ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ในน้ำเวย์เต้าหู้ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสและเติมน้ำตาลซูโครส

1.3.1 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 1,350 ml ใส่ในขวดแก้วสีชาขนาด 2.5 ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v) ปรับ pH 4.5 ด้วย 1.0 M HCl สำหรับ *S. cerevisiae* V1116 และ เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 1,350 ml ปรับ pH 7 ด้วย 1.0 M NaOH สำหรับเชื้อ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 นำขวดทั้ง 2 ปิดขวดด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเชื้อตั้งต้นทั้งสอง 150 ml/ขวด (ใช้เชื้อเริ่มต้น 10%) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง (25±5°C) วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer (ภาพ 22 ภาคผนวก ง) วัด pH ด้วยเครื่องวัด pH และค่า total soluble solid ด้วย Pocket Refractometer (ภาคผนวก ง) ทุกๆ 5 วันเป็นเวลา 20 วัน

1.3.2 การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ที่เติมน้ำตาลซูโครส 24% Brix (w/v)

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 1,350 ml ใส่ในขวดแก้วสีชาขนาด 2.5 ลิตร ปรับ pH 4.5 ด้วย 1.0 M HCl สำหรับ *S. cerevisiae* V1116 และเตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 1,350 ml ปรับ pH 7 ด้วย 1.0 M NaOH สำหรับเชื้อ *Zymomonas* sp. TISTR 1102 ปิดขวดทั้ง 2 ด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง (25±5°C) จากนั้นเติมเชื้อตั้งต้นทั้งสอง 150 ml/ขวด (ใช้เชื้อเริ่มต้น 10%) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง (25±5°C) วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer วัด pH ด้วยเครื่องวัด pH และค่า total soluble solid ด้วย Pocket Refractometer ทุกๆ 5 วันเป็นเวลา 20 วัน

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* V1116

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 0%, 25%, 50%, 75% และ 100% (v/v) ในขวดขนาด 2.5 ลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,350 ml ปรับ pH 4.5 ด้วย 1.0 M NaOH โดยแต่ละความเข้มข้นของน้ำเวย์เต้าหู้ทำ 8 ขวดการทดลอง เพื่อนำไปเติมความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดต่อไป

2.2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาลทรายและกากน้ำตาล

นำน้ำเวย์เต้าหู้ในแต่ละความเข้มข้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ในขวดขนาด 2.5 ลิตร โดยส่วนแรกจำนวน 4 ขวดการทดลองเติมน้ำตาลทรายที่ความเข้มข้น 15, 18, 21 และ 24% (w/v) ส่วนที่สองจำนวน 4 ขวดการทดลองเติมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 15, 18, 21 และ 24% (w/v) ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี และไปทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 110°C เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติมเชื้อที่คัดเลือกไว้ปริมาตร 150 ml ลงในขวดแต่ละการทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer วัด pH ด้วยเครื่องวัด pH ค่าการละลายได้ของของแข็งด้วย Pocket refractometer ค่า BOD โดยวิธีการ Azide modification และค่า total protein ด้วย Bradford Kit (ภาคผนวก ง)

2.3 การกลั่นเอทานอลจากน้ำหมัก ด้วยเครื่องกลั่นขนาด 2 ลิตร

นำน้ำหมักที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* V1116 และได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดนำไปกลั่น โดยนำน้ำหมักที่ได้เทลงขวดแก้วกลม ต่อตัวควบแน่นเข้ากับขวดแก้วกลม นำขวดแก้วตั้งบนเครื่องต้ม สังเกตและควบคุมอุณหภูมิการต้มที่ 78-85 °C เก็บตัวอย่างน้ำที่ได้จากการควบแน่นปริมาตร 300 ml วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้ด้วย Ebulliometer

2.4 การศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* V1116 ในสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอล

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 1,350 ml ใส่ในขวดแก้วสีชาขนาด 2.5 ลิตร เติมน้ำตาลซูโครสที่ 24% Brix (w/v) ปรับ pH 4.5 ด้วย 1.0 M HCl ปิดขวดด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เติมเชื้อตั้งต้น 150 ml/ขวด ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง วัด viable count ของ *S. cerevisiae* V1116 ทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 20 วัน ด้วยวิธี spread plate บนจานอาหาร YM agar (ภาคผนวก ก) ที่ความเจือจาง 10^{-5} และ 10^{-6} บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน

3. การทดสอบวิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้

3.1. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้ด้วยหม้อนึ่งอัดไอ

นำน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 500 ml ใส่ในขวดชมพู่ขนาด 1,000 ml ปิดด้วยจุกสำลี ฆ่าเชื้อด้วยเข้าหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้ที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีหม้อนึ่งอัดไอหาจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธี spread plate บนอาหาร NA (ภาคผนวก ก) และ YM

3.2. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้ด้วย Potassium metabisulfite (KMS)

นำน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 500 ml ใส่ในขวดชมพู่ขนาด 1,000 ml ปิดด้วยจุกสำลี เติม KMS จำนวน 0.2 g (400 ppm) ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย KMS หาจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธี Spread plate บนอาหาร NA และ YM

3.3. การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำเวย์เต้าหู้ด้วยวิธีการต้ม

นำน้ำเวย์เต้าหู้ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 500 ml นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วบรรจุลงขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ที่ผ่านการลวก ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างน้ำเวย์เต้าหู้ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการต้ม หาจุลินทรีย์ที่เหลือด้วยวิธี Spread plate บนอาหาร NA และ YM

4. การขยายขนาดการหมักในถังเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ขนาด 200 ลิตร

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ปริมาตร 250 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมน้ำตาลซูโครส 10% (w/v) ของปริมาณน้ำเวย์เต้าหู้ แล้วปรับ pH 4.5 โดยใช้ 1.0 M HCl ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 110°C เป็นเวลา 10 นาที ตั้งน้ำเวย์เต้าหู้ทิ้งไว้ให้เย็น เพาะเชื้อที่เจริญในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml ที่มีเชื้อตั้งต้นปริมาตร 25 ml นำไปบ่มบน Shaking incubator ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อตั้งต้นปริมาตรรวม 10 ลิตร (10% inoculums)

เตรียมน้ำเวย์เต้าหู้ 100% ปริมาตร 100 ลิตร ต้มกับน้ำตาลทราย 24 กิโลกรัม เป็นเวลา 15 นาที จนน้ำตาลทรายละลายใส่ลงในถังเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (ภาพ 8) ปรับ pH 4.5 ด้วย 1.0 M NaOH และ 1.0 M HCl เติม KMS น้ำหนัก 40 g (ที่ระดับความเข้มข้น 400 ppm) เปิดเครื่องเพื่อกวนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที แล้วปิดเครื่อง เปิดฝาเครื่องทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เติมเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10 ลิตร หมักเป็นเวลา 20 วัน วัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่ได้ด้วยเครื่อง Ebulliometer

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดกลาง

ภาพ 8 ถังหมัก ขนาด 200 ลิตร