

3. อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.1.2 ตะแกรงร่อนขนาด 150 mesh และ 20 mesh
- 3.1.3 เครื่องปั่นผสม (Blender)
- 3.1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.1.6 เครื่องผสม (Vortex)
- 3.1.7 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance)
- 3.1.8 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- 3.1.9 กระบอกฉีดยา (Syring)
- 3.1.10 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- 3.1.11 เครื่องเขย่า (Shaker)
- 3.1.12 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร และอุปกรณ์ประกอบ
- 3.1.13 เครื่องวัดเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (Pycnometer)
- 3.1.14 Spectrophotometer
- 3.1.15 กระดาษกรอง Whatman No. 1
- 3.1.16 Magnetic stirrer
- 3.1.17 Injector (แก้ว)

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 Sodium hydroxide (NaOH)
- 3.2.2 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)
- 3.2.3 Calcium alginate (CA)
- 3.2.4 Calcium chloride (CaCl_2)
- 3.2.5 Hydrochloric acid (HCl)
- 3.2.6 Purified Cellulose Powder

3.2.7 Absolute alcohol

3.2.8 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

3.2.9 Ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

3.2.10 Magnesium sulphate (MgSO_4)

3.2.11 Yeast extract

3.2.12 Bactopeptone

3.2.13 Glucose

3.2.14 Potassium cromate ($\text{K}_2\text{Cr}_4\text{O}$)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ *Trichoderma reesei* (ATCC 13631)

3.3.2 เชื้อจุลินทรีย์ *Zymomonas mobilis* (TISTR No.405)

3.4 วัสดุดิบ

3.4.1 ชั่งข้าวโพดพันธุ์ที่ 333

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมสับสเตรท (Substrate)

การเตรียมสับสเตรทจะใช้ชั่งข้าวโพดนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บในโถดูดความชื้นแล้วมัดโดยใช้เครื่องมัดสมุนไพร จากนั้นนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 20 เมช เก็บในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันความชื้น

3.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *Trichoderma reesei* (ATCC 13631)

ถ่ายสปอร์ของเชื้อ *T. reesei* จากหลอดแอมพูล ลงในอาหาร potato dextrose agar จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร potato dextrose agar slant (เตรียมตามวิธีการของศูนย์ จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 2543) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อสร้างสปอร์นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำไปใช้งาน

3.5.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหารที่ใช้หมักจะเตรียมตามวิธีของ เมนเดล และคณะ (1981) เตรียมโดยใช้ Urea 0.3 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 กรัม KH_2PO_4 2.0 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 กรัม Peptone 0.75 กรัม Yeast extract 0.25 กรัม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 มิลลิกรัม $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.6 มิลลิกรัม $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 มิลลิกรัม $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20.0 มิลลิกรัม Cellulose powder 7.5 กรัม Distilled water 1000 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนจนส่วนผสมต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารหมักที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.8 โดยใช้ ซิเตรทบัฟเฟอร์ จากนั้นนำอาหารที่จะใช้หมักไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะเติมกล้าเชื้อ

3.5.4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยซังข้าวโพดโดยเอนไซม์ เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อ *Trichoderma reesei*

3.5.4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารหมักตามข้อ 3.5.3 ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด โดยให้แต่ละขวด มีปริมาตรอาหารหมัก 50 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นของซังข้าวโพดที่เตรียมตามข้อ 3.5.1 ความเข้มข้น 1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 เปอร์เซ็นต์

3.5.4.2 วิธีการเตรียมการย่อยซังข้าวโพดให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์โดยเชื้อ *T. reesei*

เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ของ *T. reesei* จำนวน 2 มิลลิลิตร (6.7×10^8 สปอร์) เติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ทั้ง 10 ขวด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 4.8 และเขย่าให้อากาศโดยใช้เครื่องเขย่า (shaker) ที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปขยายกล้าเชื้อโดยนำแต่ละขวด ไปเติมนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแต่ละขวดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 4.8 โดยใช้ความเร็วในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำแต่ละขวดไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลสที่สร้างโดยเชื้อ *T. reesei* ด้วยวิธี การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยกระดาษกรอง (filter paper activity)

3.5.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดยเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*

3.5.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหมัก

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.5.4 แล้วจะนำมาขยายขนาดของการหมักในถังหมัก (stirred-tank fermenter) ขนาด 5 ลิตร ซึ่งใช้กล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร การหมักจะใช้อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ของการหมักที่ 4.8 ความเร็วในการกวนของใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 360 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ในระหว่างการหมักทุก 6 ชั่วโมง ตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.5.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *Z. mobilis*

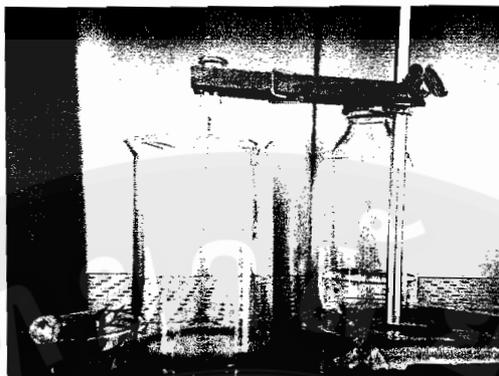
การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะเตรียมโดยใช้วิธีของศูนย์จุลินทรีย์ฯ โดยใช้ Glucose 20 กรัม Yeast extract 5.0 กรัม Distilled water 1000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนจนส่วนผสมต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้ปลอดเชื้อโดยนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เช้าให้อากาศที่ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

3.5.5.3 การขยายกล้าเชื้อ *Z. mobilis*

การเตรียมอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อ *Z. mobilis* ก่อนทำการตรึงเซลล์เตรียมโดยใช้วิธีการของศูนย์จุลินทรีย์ฯ โดยใช้ Glucose 20 กรัม Yeast extract 5.0 กรัม Distilled water 1000 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นนำไปให้ความร้อนจนส่วนผสมต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้ปลอดเชื้อโดยนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเชื้อจากข้อ 3.5.3.2 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นนำไปต้มที่ อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าให้อากาศ

3.5.5.4 การเตรียมวิธีการตรึงเซลล์ *Z. mobilis*

การตรึงเซลล์แบคทีเรีย *Z. mobilis* จะดำเนินการตามวิธีของ อมวธาและ ภูนาศคาราน Amutha และ Gunasekaran (2001) โดยนำกล้าเชื้อที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมลงในสารละลายแคลเซียมอัลจิเนท ในอัตราส่วนของกล้าเชื้อ 25 มิลลิลิตรต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นของอัลจิเนท 3.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) จะเกิดแคลเซียมอัลจิเนทขึ้นทันที แช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ แสดงดังภาพที่ 3.1 นำเจลที่ได้นำไปศึกษาคุณลักษณะการคงตัวของเม็ดเจล และลักษณะของเชื้อภายในเม็ดเจลภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 8 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการตั้งเซลล์

3.5.5.5 การศึกษาการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยเซลล์ตรึงของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis*

เมื่อเตรียมการตั้งเซลล์ของ *Z. mobilis* ตามข้อ 3.5.5.4 แล้ว จะนำไปศึกษากระบวนการหมักโดยใช้ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร ซึ่งใช้น้ำหมักจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายซังข้าวโพด โดยเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei* ซึ่งควบคุมสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ที่ 6 หมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งในทุกๆ 12 ชั่วโมง ตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของ เอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง

3.6 วิธีวิเคราะห์

3.6.1 วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) Reagent (ภาคผนวกที่ ข)

3.6.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส (ภาคผนวกที่ ข)

3.6.3 วิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอล (ภาคผนวกที่ ข)