หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วจ
TP
593
พ632ก

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุตรึงและการเตรียมวัสดุตรึงเพื่อใช้ในการหมักเอทานอล

วัสดุตรึงที่ใช้ชนิดแรกคือ ซังข้าวโพดสายพันธุ์ ซูการ์-75 โดยตัดซังข้าวโพดให้ได้ขนาดประมาณ 6x6x6 มิลลิเมตร และ 12x12x12 มิลลิเมตร นำซังข้าวโพดขนาด 6 มิลลิเมตร ตวงให้ได้ปริมาตร 105 มิลลิลิตร (30 เปอร์เซนต์ของปริมาตรทำงาน) นำซังข้าวโพดปริมาตรดังกล่าวไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นชั่งน้ำหนักซังข้าวโพดขนาด 12 มิลลิเมตร ให้มีน้ำหนักเท่ากับซังข้าวโพดขนาด 6 มิลลิเมตร นำซังข้าวโพดทั้ง 2 ขนาดไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้

วัสดุตรึงชนิดที่ 2 คือ แอปเปิ้ล พันธุ์ฟูจิ โดยหั่นแอปเปิ้ลให้ได้ขนาดประมาณ 3x3x3 มิลลิเมตร และ 6x6x6 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อดังที่กล่าวข้างต้น

3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5048 และ *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (YM broth) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงบนอาหาร YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทำกล้าเชื้อเริ่มต้นในการหมักต่อไป

3.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ยีสต์ใน YM agar slant นำมาเลี้ยงแบบเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง

3.2.3. การเตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

นำเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 15 – 18 ชั่วโมง มาเพิ่มจำนวนกล้าเชื้อโดยถ่ายลงในอาหารเดิมให้ได้จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นประมาณ $1x10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากอาหารที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปั่นล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตะกอนเซลล์ที่ได้นำไปละลายใน NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ จะได้เซลล์ยีสต์เข้มข้น นำเซลล์ยีสต์เข้มข้นเติมลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยให้มีจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นประมาณ $3x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมซังข้าวโพดปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 ลงไป บ่มที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเซลล์ตรึงรูปด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ ล้างเซลล์ตรึงรูปด้วยน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน 1 ครั้ง ก่อนนำไปใช้ในการหมักต่อไป

3.3 วัสดุอุปกรณ์และการเตรียมวัตถุดิบ

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารที่ใช้ในการตรึงเซลล์

1) อาหารเหลว YM (yeast extract malt extract broth) อาหารเหลว YM ประกอบด้วย

Yeast extract	3.0 กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0 กรัมต่อลิตร
Peptone	5.0 กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0 กรัมต่อลิตร

2) อาหารเหลว YM ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ สูตรอาหารเหลว YM ที่ใช้ในการตรึงเซลล์เหมือนกับสูตรอาหาร YM ปกติยกเว้นความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 20 กรัมต่อลิตร

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

3.3.2 การเตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้ในการหมัก

นำน้ำคั้นจากลำต้นข้าวฟ่างหวานที่แช่แข็งไว้มาทำให้ละลาย จากนั้นปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานให้เป็น 24 องศาบริกซ์โดยใช้น้ำตาลทรายในการปรับ (ภาคผนวกที่ 1) และใช้ Hand refractometer ในการวัดความหวาน จากนั้นเติม แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.3.3 สารเคมี

1) ฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2) กรดซัลฟูริกเข้มข้น
3) แอมโมเนียมซัลเฟต
4) น้ำกลั่น
5) โพรพานอล 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)
6) เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร)
7) กลูโคส (D-glucose)
8) กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitro salicylic acid)
9) โซเดียมไฮดรอกไซด์
10) โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท
11) โซเดียมคลอไรด์
12) ไฮโดรคลอริก

3.3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1) Hand refractometer (Atago, Japan)
2) Heamacytometer (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) Autoclave (UM-65 L VA, United mechanical, Thailand)
8) Microscope (Olympus Optical Co., Japan)
9) Incubator shaker (G 10 Gyrotory, New Brunswick Scientific Edison, USA)
10) Incubator chamber (78532, WTB binder, Germany)
11) Balance (BP 221S และ BP 3100S, Sartorius, Germany)
12) Centrifuge (Super T 21, Sorvall)
13) Vortex mixer (G 560E, Scientific Industry, USA)
14) Magnetic stirrer
15) Micro centrifuge (Spectrafuge 16M, Labnet, Lio Lab, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงบนซังข้าวโพด และเซลล์อิสระ โดยการหมักแบบกะ

3.4.1.1 เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อดังข้อ 3.3.2 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ที่ป้องกันอากาศเข้า หรือฟลาสก์แอร์ล็อก (air-locked flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.1.2 เตรียม *S. cerevisiae* TISTR 5048 ตรึงรูปบนซังข้าวโพดทั้ง 2 ขนาดดังข้อ 3.2.3 จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้ใส่ลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในข้อ 3.4.1.1 โดยใช้ปริมาตรเซลล์ตรึง 30 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทำงาน (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.1.3 การหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ ทำโดยนำเซลล์ยีสต์เข้มข้นที่ละลายใน NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ในข้อ 3.2.3 มาเติมลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในข้อ 3.4.1.1 โดยให้มีจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานประมาณ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.1.4 นำฟลาสก์ในข้อ 3.4.1.2 และ 3.4.1.3 ไปบ่มที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 32, 40, 48, 56, 64 และ 72 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์

- พีเอช โดยใช้ พีเอชมิเตอร์

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นองศาบริกซ์โดย Handrefractometer (ภาคผนวกที่ 2)

- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (ภาคผนวกที่ 3)

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS (ภาคผนวกที่ 4)

- ปริมาณเอทานอล โดย Gas Chromatography (ภาคผนวกที่ 5)

- ปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในน้ำหมัก โดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วยเมทิลลีนบลู และนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ Heamacytometer (ภาคผนวกที่ 6)

3.4.1.5 คำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ (yield) และอัตราผลผลิต (productivity) เอทานอลเมื่อใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปและเซลล์ยีสต์อิสระในการหมัก

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

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

3.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงบนซังข้าวโพด โดยการหมักแบบกะซ้ำ

3.4.2.1 เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อดังข้อ 3.3.2 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์แอร์ล็อก ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.2.2 เตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนซังข้าวโพดดังข้อ 3.2.3 (โดยใช้ซังข้าวโพดขนาดที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงสุดที่ได้จากการทดลองที่ 3.4.1) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้เติมลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในข้อ 3.4.2.1 โดยใช้ปริมาตรเซลล์ตรึง 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทำงาน (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.2.3 นำไปบ่มที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 8, 24, 40 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ พีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นองศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และปริมาณเซลล์อิสระที่อยู่ในน้ำหมัก

3.4.2.4 คำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอล ดังในข้อ 3.4.1.5

3.4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* NP 01 ที่ถูกตรึงบนซังข้าวโพด โดยการหมักแบบกะซ้ำ

3.4.3.1 เตรียมน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อดังข้อ 3.3.2 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์แอร์ล็อก ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.3.2 เตรียมเซลล์ยีสต์ตรึงรูปบนซังข้าวโพดดังข้อ 3.2.3 (โดยใช้ซังข้าวโพดขนาดเดียวกันกับใช้ในการทดลอง 3.4.2) จากนั้นนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปที่ได้ลงในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อในข้อ 3.4.3.1 โดยใช้ปริมาตรเซลล์ตรึง 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทำงาน (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

3.4.3.3 นำไปบ่มที่สภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 8, 24, 40 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ดังข้อ 3.4.2.3

3.4.3.4 คำนวณความเข้มข้นเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตเอทานอลดังในข้อ 3.4.1.5

3.4.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *S. cerevisiae* NP 01 โดยการหมักแบบกะซ้ำ

เปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตของเอทานอล เมื่อใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *S. cerevisiae* NP 01 ที่ได้จากการทดลอง 3.4.2. และ 3.4.3 โดยใช้วิธีทางสถิติคือ วิธี t-test

3.4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงบนแอปเปิ้ล โดยการหมักแบบกะซ้ำ

หมักเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงบนแอปเปิ้ลขนาด 3x3x3 มิลลิเมตร และ 6x6x6 มิลลิเมตร โดยการหมักแบบกะซ้ำ โดยทำการหมัก เก็บตัวอย่าง และคำนวณประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ดังข้อ 3.4.2

3.4.6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเมื่อใช้วัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ โดยการหมักแบบกะซ้ำ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้ และอัตราผลผลิตของเอทานอล จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงบนซังข้าวโพด และแอปเปิ้ล (จากการทดลองที่ 3.4.2 และ 3.4.4) กับค่าดังกล่าวของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานด้วยกระบวนการหมักแบบกะซ้ำโดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจีเนต (อมรรัตน์ และ อรุณ, 2547) โดยเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS