

บทที่ 3 แนวทางการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

1. กากน้ำตาล
2. น้ำอ้อย
3. ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ S5
4. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (Absolute ethyl alcohol, Merck, Germany)
5. วุ้น (Agar Powder, Biomark, India)
6. Glucose monohydrate (Univar, Australia)
7. ยีสต์สกัด (Yeast extract, Commercial grade)
8. กรดกำมะถัน 98 เปอร์เซ็นต์ (Sulfuric acid, Merck, Germany)
9. ฟีนอล (Phenol, Merck, Germany)
10. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate, Commercial grade)
11. 3,5 -dinitrosalicylic acid (DNS, Fluka, Switzerland)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Commercial grade)
13. Sodium potassium tartrate (Commercial grade)
14. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate, Commercial grade)
15. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate, Commercial grade)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั่นแยกแรงเหวี่ยง (Centrifuge, Hettich EBA 20, Germany)
2. เครื่องหมุนผสม (Vortex shaker, Scientific industries Inc., Vortex-genie2, USA.)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Odyssey DR/2500, Hach Company, USA.)
4. เครื่องเขย่า (Incubator shaker-Innova 4340, New Brunswick Scientific, USA.)
5. หม้อนึ่งไอน้ำแรงดัน (Autoclave, Rexall Industries LS-2D, Taiwan)
6. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminarflow, Holten lamiar Model 1,5 , Denmark)
7. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter, CyberScan 510, Eutech Instruments)
8. เครื่องชั่ง (Laboratory balances, Extend ED3202S-CW, Sartorius Corporation, Germany)
9. เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer, Salleron-Dujardin ebulliometer No. 10051, France)

3.3 การเตรียมวัตถุดิบ

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ตั้งต้น

1. ถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ S5 จาก stock culture ลงบนอาหารแข็ง (slant YM agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
2. เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจาก YM broth (Yeast extract Malt extract broth) 2.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น
3. ถ่ายยีสต์จากอาหารแข็ง (slant YM agar) ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ นำไปบ่มใน Incubator shaker เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อยีสต์เริ่มต้นในการหมักต่อไป

3.3.2 การเตรียมน้ำตาล

1. นำกากน้ำตาลมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน
2. นำกากน้ำตาลที่ผสมน้ำแล้วไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
3. ทำการแยกตะกอนออกจากกากน้ำตาลโดยนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
4. นำกากน้ำตาลที่ผ่านการแยกตะกอนออกไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ก่อนนำมาใช้ต้องทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลตามต้องการก่อนทำการหมัก

3.3.3 การเตรียมน้ำอ้อย

1. นำน้ำอ้อยไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
2. ทำการแยกตะกอนออกจากกากน้ำตาลโดยนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
3. ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกให้มีความหวานเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์บริกซ์
4. นำน้ำอ้อยเข้มข้นไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ก่อนนำมาใช้ต้องทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลตามต้องการก่อนทำการหมัก

3.3.4 การเตรียมอาหารเสริม และเกลือแร่ [42]

1. ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร
2. แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร
4. แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร

3.4 ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก

1. เตรียมกากน้ำตาล/น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120, 170, 200, 230 และ 260 กรัมต่อลิตร ปรับให้มีปริมาตร 1,620 มิลลิลิตร
2. นำกากน้ำตาล/น้ำอ้อย ที่ปรับปริมาตรแล้ว เติมเกลือแร่ (ตามข้อ 3.3.4) และปรับค่าความเป็นกรดดังเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เทใส่ในขวด Duran ขนาด 2 ลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. ถ่ายกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม (ตามข้อ 3.3.1) ลงไปในขวด Duran ขนาด 2 ลิตรให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (180 มิลลิลิตร)
4. ทำการหมักเอทานอลเป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยมีการกวนตลอดเวลา เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่เก็บไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกนำส่วนใสเก็บ และตะกอนออก
6. นำส่วนตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยวิธีวัดความขุ่น
7. นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer



3.5 ศึกษาการหมักเอทานอลโดยการนำน้ำกากส่ามาเจือจางจากน้ำตาล

1. เตรียมกากน้ำตาลโดยใช้กากส่าเจือจางแทนน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ที่ปริมาณการใช้น้ำกากส่าในปริมาณ 0, 10, 30, 50, 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปรับให้มีปริมาตร 1,620 มิลลิลิตร
2. นำกากน้ำตาล/น้ำอ้อย ที่ปรับปริมาตรแล้ว เดิมเกลือแร่ (ตามข้อ 3.3.4) และปรับค่าความเป็นกรดต่ำเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เทใส่ในขวด Duran ขนาด 2 ลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. ถ่ายกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม (ตามข้อ 3.3.1) ลงไปในขวด Duran ขนาด 2 ลิตรให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (180 มิลลิลิตร)
4. ทำการหมักเอทานอลเป็นเวลา 60 ชั่วโมง โดยมีการกวนตลอดเวลา เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างที่เก็บไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกนำส่วนใสเก็บ และตะกอนออก
6. นำส่วนตะกอนไปล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ด้วยวิธีวัดความขุ่น
7. นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer