



บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์และวัตถุดิบ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

หัวแก่่นตะวันที่ใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 3.1) ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ภาพที่ 3.1 หัวแก่่นตะวันที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

3.2 อุปกรณ์ เครื่องมือวิเคราะห์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์

ชนิดเครื่องมือ	แบบรุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV – 1601 UV – 2501	Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Digital pH meter)	PHM 210	Radiometer Copenhagen, France
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)	Hiclave HV – 85	Hirayama, Japan
4. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (Fermenter)	Biostat – B	B. Braun Biotech International, Germany
5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	G560E	Scientific industries, USA
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความ เย็น (Centrifuge)	Sorvall RC – 26 PLUS	Dupont, USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความ เย็น (Microcentrifuge)	SIGMA 1 K 15	SIGMA Laboratory centrifuge, USA
8. เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	PR 530 Delta Range	Mettler – Toledo, Germany
9. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)		Europeene, R.D. Flufrance
10. ตู้อบ (Hot air oven)	FD240	WTC Binder, Germany
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography)	GC 14B 20% PEG-20M C-R7 Ae plus Chromatopac	Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan Shimadzu, Japan
12. รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand-Held refractometer)	N-1	Atago
13. เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	LC- 10 AD	Shimadzu, Japan

3.2.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี (ชื่อทางการค้า)	บริษัทผู้ผลิต
1. กรดซัลฟิวริก (เกรดวิเคราะห์)	MERK, Germany
2. กลูโคส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERK, Germany
4. ซูโครส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
5. ฟรุคโตส (เกรดวิเคราะห์)	Sigma, Chemical Company, USA
6. เอทานอล (เกรดสำหรับ GC หรือ HPLC)	MERK, Germany
7. อินูลิน	Fluka, Switzerland
8. เอนไซม์อินูลิเนส	Fluka, Switzerland
9. ฟีนอลซัลฟิวริก	MERK, Germany
10. โซเดียมคาร์บอเนต	MERK, Germany
11. โปแตสเซียมเมทอะไบซัลไฟด์	MERK, Germany
12. โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรต	MERK, Germany

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Yeast extract-Peptone-Glucose (YPG) (3% glucose) มีองค์ประกอบ ดังนี้

Glucose	30	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

เตรียม โดยการละลายส่วนผสมรวมกันในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร สำหรับอาหารแข็งให้เติมวุ้นผง (agar) 20 กรัม ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที

3.4 วิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์

เก็บรักษาเชื้อ *Z. mobilis* บนอาหารแข็งสูตร YPG โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงสู่อาหารแข็งใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.5 วิธีเตรียมน้ำสกัดจากหัวแ่งนตะวันเพื่อใช้ผลิตเอทานอล

นำหัวแ่งนตะวันมาทำความสะอาด แล้วสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเครื่องขูดมะพร้าว จากนั้นนำไปบีบสกัดน้ำจากหัวแ่งนตะวันโดยใช้เครื่องคั้นกะทิ และเก็บน้ำสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำสกัดจากหัวแ่งนตะวัน

3.6.1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

นำน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol – sulphuric (ภาคผนวก ก) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ก)

3.6.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณของอินูลิน (inulin)

นำน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณของอินูลินตามวิธีการของ Wei Lingyun (2006) (ภาคผนวก ก)

3.6.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุบางชนิด

หาปริมาณของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่อยู่ในน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวัน ดังนี้ ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) โซเดียม (Na) แมกนีเซียม (Mg) แคลเซียม (Ca) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) สังกะสี (Zn) ซัลเฟอร์ (S) และ คลอไรด์ (Cl) โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง atomic absorption (AA) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาปฐพี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.6.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 548

นำ *Z. mobilis* จาก stock culture ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 1 ลูปเต็ม (loop full) ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร YPG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ลงสู่อาหารเหลวสูตร YPG และบ่มที่สภาวะเดิมจนเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ exponential (ค่า OD550 ประมาณ 0.8-1.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จึงนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.6.3 การศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPG และในน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวัน

บรรจุน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวัน และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YPG ปริมาตร 360 มิลลิลิตร ลงในฟลากส์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้น 40 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ปิดฟลากส์ด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ จนถึงที่เวลามาก 78 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าของแข็งละลาย และความเข้มข้นของมวลเซลล์

3.6.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแค้นตะวันโดยใช้ *Z. mobilis* ในระดับฟลากส์ ด้วยวิธีการหมักแบบกะ

3.6.4.1 การศึกษาวิธีการปรับสภาพวัตถุดิบเริ่มต้นก่อนการหมัก

ก) การปรับสภาพด้วยกรด (Szambelan et al., 2004)

นำน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันที่เตรียมไว้มาวัดค่าของแข็งละลาย และค่าความเป็นกรดค้างเริ่มต้น เพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดค้างให้ได้ค่าเท่ากับ 2.0 ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น นำน้ำสกัด

จากหัวแ่งตะวันที่ปรับค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงร้อยแล้วมาให้ความร้อนด้วยวิธีการนึ่งด้วยความดันไอน้ำ เป็นเวลา 40 นาที โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ดังนี้ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส ทั้งให้เย็น แล้วปรับค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงให้ใกล้เคียง 5.0 ด้วยสารละลาย 5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แบ่งน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่มีวุ้นน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าของแข็งละลาย ส่วนของน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่เหลือนี้นำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดสอบการหมักในขั้นตอนต่อไป

ข) การปรับสภาพด้วยเอนไซม์อินูลินส (Szambelan et al., 2004)

นำน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่เตรียมไว้มาวัดค่าของแข็งละลาย และค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงเริ่มต้นเพื่อใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อินูลินส (Sigma-Aldrich, 17 U/g) ที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* (ใช้ในอัตรา 0.02 g/kg tuber) โดยปรับค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงของน้ำสกัดหัวแ่งตะวันที่เป็น 5.0 หลังจากเติมเอนไซม์แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาวัดน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าของแข็งละลาย ส่วนของน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่เหลือนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อทดสอบการหมักในขั้นตอนต่อไป

3.6.4.2 การศึกษาหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงเริ่มต้นของสูตรอาหารที่

เหมาะสมในการหมักเอทานอล

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาควบคู่กันระหว่างปริมาณเชื้อเริ่มต้นและค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงเริ่มต้นของสูตรอาหาร โดยนำน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาตร 400 มิลลิลิตร บรรจุลงในฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด - ค่าเบี่ยง (pH) ของน้ำหวานจากหัวแ่งตะวันที่เป็น 5.0, 6.0 และ 7.0 ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นโดยการแปรผันให้มีปริมาตรของเชื้อเริ่มต้นที่เดิมต่างๆ กันดังนี้ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 78 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด - ค่าเบี่ยง ค่าของแข็งละลายและความเข้มข้นของเอทานอล

3.6.4.3 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

นำน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่ผ่านการย่อยด้วยวิธีการที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปปรับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคสให้มีค่าเป็น 250, 280 และ 300 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรดค่าเบี่ยงเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.2 จากนั้นบรรจุน้ำสกัดจากหัวแ่งตะวันที่ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาสขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.2 ปิดฟลาสด้วย air lock ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ จนถึงเวลาหมัก 78 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด - ค่าเบี่ยง ค่าของแข็งละลายและความเข้มข้นของเอทานอล

3.6.4.4 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

นำน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันตกที่ผ่านการย่อยด้วยวิธีการที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.1 ไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปปรับค่าความเข้มข้นของน้ำตาล เริ่มต้นให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 4.6.4.3 และปรับค่าความเป็นกรดค่าเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้จากการศึกษา ในข้อ 3.6.4.2 จากนั้นเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียม ซัลเฟต และยูเรีย โดยแปรผันความเข้มข้นในช่วง 0-1.0 กรัมต่อลิตร จากนั้นบรรจุน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันตกปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 นาที ทั้งให้เย็นในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นเติมกลัเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จาก การศึกษาในข้อ 3.6.4.2 ปิดฟลาस्कด้วย air lock ที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ จนถึงเวลาหมัก 78 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้น ของน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด – ค่าของแข็งละลายและความเข้มข้นของเอทานอล

3.6.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันตกโดยใช้ *Z. mobilis* ในระดับขยายส่วน ด้วยวิธีการหมักแบบกะ

นำสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่ได้จากการศึกษาในระดับฟลาस्कจากข้อ 3.6.4 มาผลิตเอทานอล ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยนำน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวันตกที่ผ่านการย่อยด้วยวิธีการที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.1 ไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับความเข้มข้นของน้ำตาล เริ่มต้นให้มีค่าที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.6.4.3 และปรับความเป็นกรดค่าเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้จาก การศึกษาตามข้อ 3.6.4.2 บรรจุน้ำสกัดหัวแค้นตะวันตกปริมาตร 3.5 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร นำไปนั่งด้วยเครื่อง นั่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ทั้งให้เย็นและเติมกลัเชื้อลงไปปริมาตรที่ เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.6.4.3 ทำการเชื่อมต่ออุปกรณ์ต่างๆ เข้ากับชุดควบคุม โดยกำหนดอัตราการกวนที่ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ช่วงเวลาต่างๆ และนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด ค่าความเป็นกรด – ค่าของแข็งละลาย ความเข้มข้นของมวลเซลล์ และความเข้มข้นของเอทานอล

3.7 วิธีการคำนวณ

วิธีคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญของการผลิตเอทานอล แสดงดังต่อไปนี้

- 1) อัตราผลผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบกะ
- อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) =

ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)

ระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)
- 2) ผลได้ของเอทานอล (Yp/s)
- ผลได้เอทานอล

(กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)
- =

ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)

ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)

3) ผลได้ของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี (Theoretical yield)

$$\frac{\text{ผลได้ของเอทานอลจากกระบวนการ}}{\text{การหมักเทียบกับทฤษฎี (เปอร์เซ็นต์)}} = \frac{Y_{p/s} \times 100}{0.51}$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของเอทานอล (กรัมเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)

0.51 คือ ผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎี เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตส