บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลังและเปลือกสับปะรด

วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลของงานวิจัยนี้มี 2 ชนิด คือ

ก. กากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซื้อจากลานมันสำปะหลัง อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ผ่านการตากแห้งและบดให้มีอนุภาค 80- 100 mesh ก่อนนำไปเป็นสับสเตรทในการหมักแข็งสำหรับการผลิตจุลินทรีย์ผสม TY ชนิดผงแห้ง

ข. เปลือกสับปะรดซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตบรั่นดี บริษัท สยามไวน์เนอร์รี จำกัด ผ่านการตากแห้งและบดให้มีอนุภาค 1- 5 mm ก่อนนำไปเป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ผสม TY ชนิดผงแห้ง

วิธีการทดลองหาองค์ประกอบของเปลือกสับปะรด เช่น ปริมาณของเซลลูโลสโดยใช้วิธีการไตเตรชัน [16] ลิกนิน [17] และน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นด้วยวิธีดีเอ็นเอส [18]

3.2 วิธีการปลูกถ่ายเชื้อเดี่ยว

เชื้อเดี่ยว หมายถึง จุลินทรีย์บริสุทธิ์หนึ่งสายพันธุ์ นำมาปลูกถ่ายหรือเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งที่เหมาะสม เช่นไตโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (*T. reesei* RT-P1) และแซคคาโรมายซีส สิรีวิซิอี RIT-P2 (*S. cerevisiae* RT-P2) แต่ละสายพันธุ์เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (PDA) และวายเอ็มเอ (YMA) ตามลำดับ

วิธีการปลูกถ่ายเชื้อเดี่ยว ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น

3.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT01

ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เป็นเชื้อรา ลักษณะภายนอกที่มองเห็นด้วยตาเปล่ามีสีเขียวบนอาหารเต็มพื้นที่ ปลูกถ่ายไว้ในหลอดวุ้นเอียง นำมาเพาะเลี้ยงต่อบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ ดังรูป 3.1 ซึ่งมีวิธีการดังนี้

การเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอตามสูตร คือ ละลาย potato dextrose agar ปริมาณ 39 กรัม ในน้ำอาร์โอปริมาตร 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันปืนเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 120 ^{o}C และความดัน 14.7 psig หลังจากนั้นนำมาเทลงบนจานเพาะเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อจะได้อาหารวุ้นแข็ง นำเข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมมาเขี่ยไตรโคเดอร์มา รีสิอี จากหลอดวุ้นเอียง ไปวางบนอาหารวุ้นแข็งตรงบริเวณศูนย์กลางของจาน ปิดฝาจานแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีความเชื้อ ไตรโคเดอร์มา รีสิอีจะเติบโตเต็มที่เป็นสีเขียวบนอาหารวุ้นแข็ง ใช้เวลาประมาณ 7-12 วัน เก็บตัวอย่างศึกษาสัณฐานทางจุลชีววิทยาโดยใช้

กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบเพื่อวัดขนาดกว้าง ยาว ขององค์ประกอบต่างๆ ของสปอร์ เช่น ก้านชูสปอร์ (conidiophores), โคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) และ สปอร์ (conidia) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM)

รูปที่ 3.1 ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 เติบโตบนอาหารแข็งพีดีเอ

3.2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงแซคคาโรมายซีส ซีรีวิสิอี RT-P2

แซคคาโรมายซีส ซีรีวิสิอี RT-P2 มีลักษณะภายนอกที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นเม็ดสีขาว กระจายเป็นโคโลนีเดี่ยว อาหารเพาะเลี้ยงยีสต์คืออาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอ ดังรูป 3.2 ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

การเตรียมอาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอ คือ ละลายยีสต์ แอ็กซ์แทร็ก 3 กรัม มอลต์ แอ็กซ์แทร็ก 3 กรัม เบคโต-เปปโตน 5 กรัม กลูโคส 20 กรัม และวุ้น 20 กรัม ลงในน้ำอาร์โอปริมาตร 1 ลิตร นำสารละลายที่ได้ไปทำให้ปลอดเชื้อ และเทลงจานเพาะเชื้อเหมือนการเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ แต่จะได้อาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอ นำลูปเขี่ยเชื้อยีสต์จากหลอดวุ้นเอียง มาเขี่ยลากบนอาหารวายเอ็มเอ ปิดฝาจานด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ยีสต์จะเติบโตเต็มที่ภายใน 3 วัน สังเกตจากการเกิดโคโลนีเดี่ยวกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ เก็บตัวอย่างศึกษาสัณฐานทางจุลชีววิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

รูปที่ 3.2 แซคคาโรมายซีส ซีรีวิสิอี RT-P2 เติบโตบนอาหารแข็งวายเอ็มเอ

3.3 วิธีการปลูกถ่ายเชื้อผสม TY

เชื้อผสม TY หมายถึง จุลินทรีย์ผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บริสุทธิ์สองสายพันธุ์ร่วมกันในอาหารวุ้นแข็ง การทดลองนี้เพื่อหาอาหารวุ้นแข็งที่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 (T) ร่วมกับแซคคาโรมายซีส ซิรีวิสิอี RT-P2 (Y) โดยการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ลงบนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (PDA) เปรียบเทียบกับวายเอ็มเอ (YMA) ดังต่อไปนี้

3.3.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ

วิธีการเตรียมอาหารวุ้นแข็งพีดีเอเหมือนวิธีการทดลอง 3.2.1 ต่างกันตรงที่ ทำการเขี่ยเชื้อไตรโคเดอร์มา รีสิอี มาวางตรงกลางจานเท่ากับปลายเข็มเขี่ยเชื้อ แล้วเขี่ยลากเชื้อยีสต์จำนวน 3 โคโลนีลงบริเวณที่เหลือบนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ถ่ายรูปและนับปริมาณเชื้อทั้งหมด [14] ในจานทุกวันเป็นเวลา 7 วัน ดังรูปที่ 3.3 (ก) เก็บตัวอย่างวัดความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ทุกวัน

3.3.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอ

วิธีการทดลองเหมือนวิธีการทดลอง 3.3.1 ต่างกันเพียงใช้อาหารวุ้นแข็งวายเอ็มเอแทนพีดีเอ ดังรูปที่ 3.3 (ข) เก็บตัวอย่างวัดความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ทุกวัน

3.3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งที่เหมาะสม

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY เหมือนวิธีการทดลอง 3.3.1 โดยใช้อาหารแข็งที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองเปรียบเทียบจากวิธีการทดลอง 3.3.1 กับ 3.3.2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมที่มีอายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน บนอาหารแข็งสำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 วิธีการหาสภาวะเหมาะสมของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อผสม TY

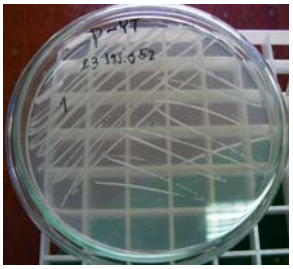
วิธีการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อผสม TY มี 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.4.1 วิธีการหาสูตรและปริมาณอาหารเหลวที่เหมาะสมของเชื้อผสมที่มีอายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

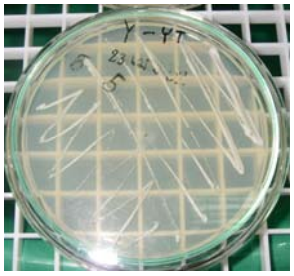
ก. นำกากมันสำปะหลังแห้ง (CW) ลดขนาดด้วยการบด ขนาดไม่เกิน 100 mesh ปริมาณ 100 กรัมต่อถุง จำนวน 18 ถุง ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 ^{o}C ความดัน 15 psi นาน 15 นาที ดังรูปที่ 3.4

ข. การเตรียมอาหารเหลว LM-pH5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด โดยละลาย 1 กรัม $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, 1 กรัม $MgSO_4$, ปุ๋ยยูเรีย 8 กรัม [(46% $NH_4)_2SO_4$], ปุ๋ยโมโน โปแตสเซียมฟอสเฟต 15 กรัม (NPK: 0-52-34) และน้ำตาลมะพร้าวในสารละลายแต่ขวดๆ ละ 10 กรัม 20 กรัม 30 กรัม และ 40 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำอาร์โอเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร ทำสารละลายที่ได้ให้ปลอดเชื้อเหมือนวิธีการทดลอง 3.4.1 ก. ก่อนปรับพีเอชเท่ากับ 5 อาหารเหลวที่ได้แต่ละขวดมีความเข้มข้นของน้ำตาลมะพร้าวเท่ากับ 10, 20, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.5

เชื้อผสม TY บนพีดีเอ อายุ 1 วัน



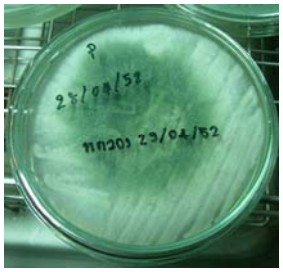
เชื้อผสม TY บนวายเอ็มเอ อายุ 1 วัน



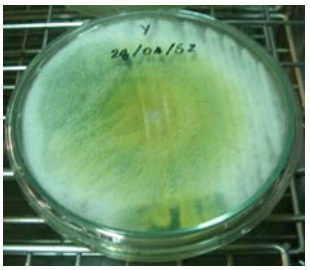
เชื้อผสม TY บนพีดีเอ อายุ 3 วัน

เชื้อผสม TY บนวายเอ็มเอ อายุ 3 วัน

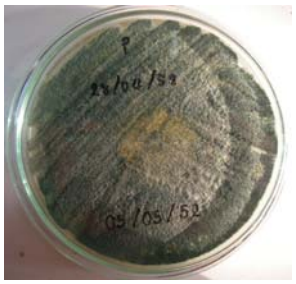
เชื้อผสม TY บนพีดีเอ อายุ 5 วัน



เชื้อผสม TY บนวายเอ็มเอ อายุ 5 วัน



เชื้อผสม TY บนพีดีเอ อายุ 7 วัน



เชื้อผสม TY บนวายเอ็มเอ อายุ 7 วัน

(ก) (ข)

รูปที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY อายุ 1 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วันบนอาหารวุ้นแข็ง (ก) พีดีเอ (ข) วายเอ็มเอ

รูปที่ 3.4 กากมันสำปะหลังแห้งและอาหารเหลว LM-pH5

รูปที่ 3.5 เชื้อผสม TY อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ในอาหารเหลวความเข้มข้นน้ำตาลมะพร้าว 10 กรัมต่อลิตร

ค. การเพาะเลี้ยงเชื้อผสม TY บนอาหารวุ้นแข็งที่เหมาะสมได้จากวิธีการทดลอง 3.3 ซึ่งพบว่าเชื้อผสมเติบโตได้ดีบนอาหารแข็งพีดีเอ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมแบ่งออกเป็น 3 ชุด คือชุดที่ 1 เชื้อผสมอายุ 3 วัน (TY-P 3 day) ชุดที่ 2 เชื้อผสมอายุ 5 วัน (TY-P 5 day) และชุดที่ 3 เชื้อผสมอายุ 7 วัน (TY-P 7 day) การเพาะเลี้ยงเชื้อผสมแต่ละชุดทำได้โดยใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยเชื้อไตรโคเดอร์มาบริสุทธิ์ (T-P) วางตรงกลางจานอาหารแข็งพีดีเอ 1 จุด และใช้ลูปเขี่ยลากยีสต์บริสุทธิ์ (Y-P) จำนวน 3 โคโลนีลงบนมุมหนึ่งของจานเดียวกัน จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงแต่ละชุดวางไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้องใช้ระยะเวลา 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ดังตาราง 3.1 เมื่อครบกำหนดนำมาส่องกล้องหาความเข้มข้นของจุลินทรีย์ในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

ง. การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลมะพร้าวในอาหารเหลว LM-pH5 ที่แปรผัน 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตร 30 กรัมต่อลิตร และ 40 กรัมต่อลิตร และปริมาตรอาหารเหลวที่แปรผัน 60 มิลลิลิตร 80 มิลลิลิตร และ 100 มิลลิลิตร วิธีการทดลองคือเขี่ยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ผสมอายุ 3 วันที่อยู่บน

ผิวอาหารวุ้นแข็งพีดีเอลงในอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 2 จาน ต่อหนึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลมะพร้าว ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนแม่เหล็กนาน 30 นาที ซึ่งคือหัวเชื้อผสมเริ่มต้น ทำการหมักแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลัง 100 กรัมกด้วยหัวเชื้อผสมปริมาตรต่างๆ เก็บตัวอย่างเพื่อวัดจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

จ. วิธีการทดลองการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อผสม TY อายุ 5 และ 7 วัน เหมือนการทดลอง ง. ยกเว้นใช้เชื้อผสม TY อายุ 5 (TY-P 5 day) และ 7 วัน (TY-P 7 day) ในอาหารเหลวแทนเชื้อผสม TY อายุ 3 วัน

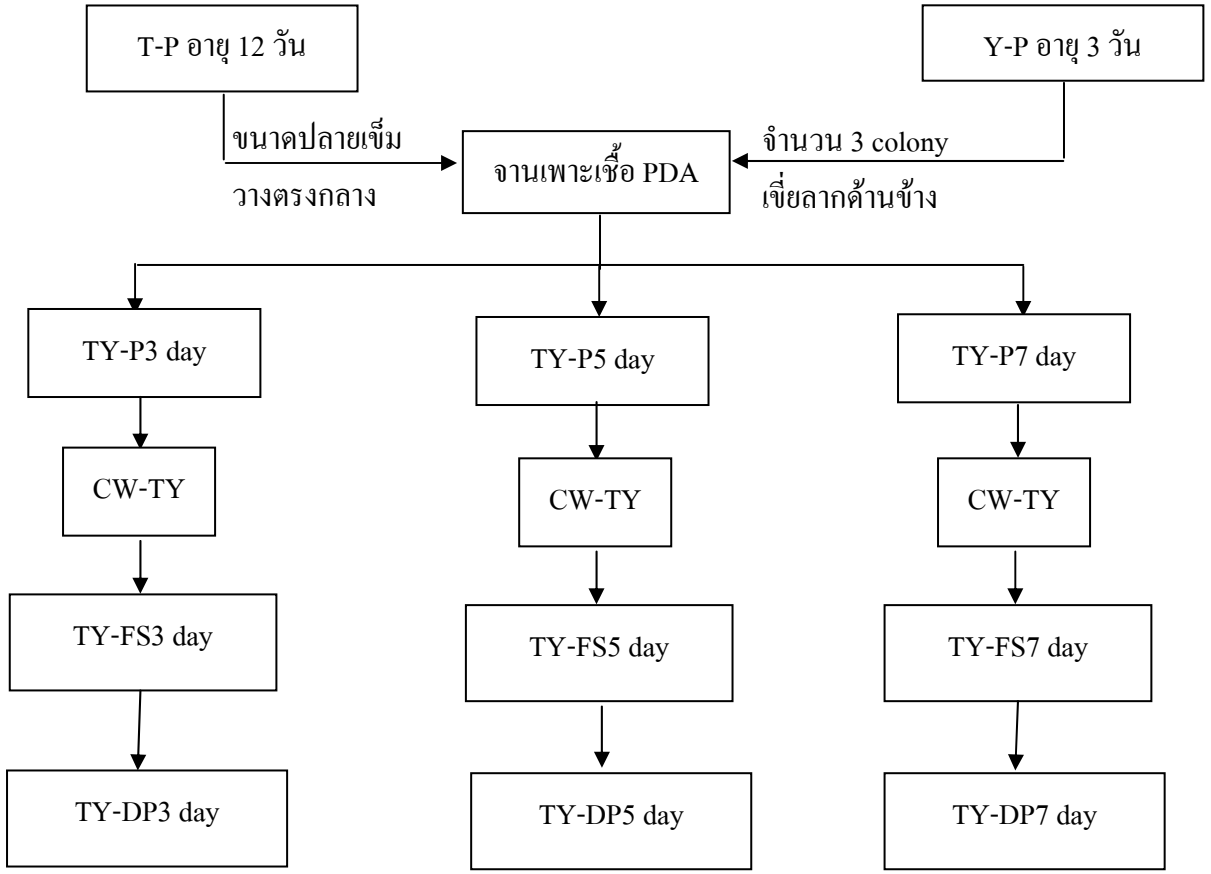
3.4.2 วิธีการหมักแข็งกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเชื้อผสม TY ชนิดผงแห้งที่มีอายุ 3 วัน (TY-P 3 day) 5 วัน (TY-P 5 day) และ 7 วัน (TY-P 7 day)

ใช้วิธีเหมือนการทดลอง 3.4.1 ที่สภาวะเหมาะสม เก็บตัวอย่างเพื่อวัดจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตรทุกวันเป็นเวลา 7 วัน อบแห้งผลิตภัณฑ์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C นาน 2-3 ชั่วโมง จะได้เชื้อผสมชนิดผงแห้ง 3 ชุด คือเชื้อผสม TY ชนิดผงแห้งที่มีอายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน ใช้แทนด้วย TY-DP3 day, TY-DP5 day และ TY-DP7 day ตามลำดับ ซึ่งความชื้นของเชื้อผสมชนิดผงแห้งต้องไม่มากกว่าร้อยละ13 เพื่อนำไปใช้ทำการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดต่อไป ดังรูปที่ 3.6

(ก) (ข)

รูปที่ 3.6 เชื้อผสม TY ในกากมันสำปะหลัง (ก) เชื้อผสม TY สดก่อนการอบแห้ง (ข) เชื้อผสม TY ชนิดผงแห้ง หลังการอบ

วิธีการทดลองการหาสภาวะเหมาะสมของการหมักแข็งกากมันสำปะหลังด้วยเชื้อผสม TY สรุปได้ดังรูปที่ 3.7



คำย่อ	ความหมาย
T-P	ไตรโคเดอร์มา รีสิอี RT-P1 บนจานวุ้นแข็งพีดีเอ
Y-P	แซคคาโรมายซิส ซีรีวิสิอี RT-P2 บนจานวุ้นแข็งพีดีเอ
TY-P	เชื้อผสมระหว่าง T-P และ Y-P
CW-TY	เชื้อผสมเลี้ยงบนกากมันสำปะหลัง
TY-FS	เชื้อผสมชนิดสดที่ได้จากการเลี้ยงบนกากมันสำปะหลัง
TY-DP	เชื้อผสมชนิดผงแห้งที่ได้จากการเลี้ยงบนกากมันสำปะหลัง

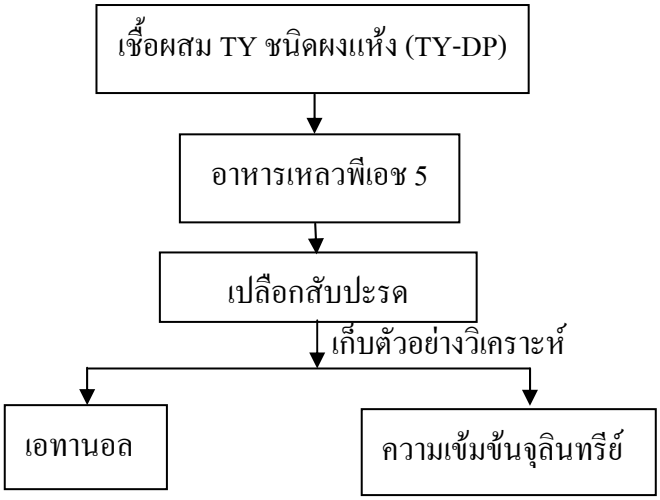
รูปที่ 3.7 แผนภาพการหมักแข็งกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเชื้อผสมชนิดผงแห้งจากเชื้อผสมอายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

3.5 วิธีการหาสภาวะของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY

การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสมชนิดผงแห้ง 3 ชุด คือ TY-DP3 day, TY-DP5 day และ TY-DP7 day การทดลองโดยใช้วิธีออร์โธโกนอลสำหรับแต่ละชุด แปรผันปัจจัยควบคุม 4 พารามิเตอร์ แบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้คือ

- น้ำหนักเปลือกสับปะรดหลังการปรับสภาพ (PAW) 8%w 10%w และ 12%w
- ร้อยละโดยน้ำหนักของเชื้อผสม (TY-DP) 4%w 5%w และ 6%w
- น้ำตาลมะพร้าวเริ่มต้นในอาหารเหลว (CSG) 1%w 2%w และ 3%w
- ระยะเวลาที่ใช้หมัก (วัน) 2 วัน 3 วัน และ 4 วัน

ตัวแปรคงที่ คือปริมาตรอาหารเหลว 100 มิลลิลิตรที่พีเอช 5 และอุณหภูมิ 26 °C ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักวิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อผสม TY และความเข้มข้นเอทานอลที่ได้เพื่อใช้หาคำนวณสภาวะที่เหมาะสมตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอล [20]-[21] จำนวน 9 การทดลอง ดังรูปที่ 3.8 รูปที่ 3.9 และตารางที่ 3.1 ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 แผนภาพการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY ชนิดผงแห้ง

3.6 วิธีการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ที่สภาวะเหมาะสม

วิธีการทดลองการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP เหมือนวิธีการทดลอง 3.5 ยกเว้นใช้ตัวแปรต่างๆ ที่สภาวะเหมาะสมเป็นตัวแปรคงที่ แปรผันเฉพาะอายุของเชื้อผสม TY-DP ที่อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

อาหารเหลวและเปลือกสับปะรด

หัวเชื้อผสม TY ในอาหารเหลว

เปลือกสับปะรดในหัวเชื้อผสม TY

วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่า

รูปที่ 3.9 การหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY-DP ใน อาหารเหลวโดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอล

ตารางที่ 3.1 ตัวแปรของแต่ละการทดลองด้วยวิธีออร์โธโกนอลของการหมักเอทานอลจากเปลือกสับปะรดด้วยเชื้อผสม TY ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเหลวที่พีเอช 5 และอุณหภูมิ 26°C

No	PAW (g)	Glucose (g)	TY-DP (g)	Time (day)
1	8	1	6	4
2	10	1	4	2
3	12	1	5	3
4	8	2	5	3
5	10	2	6	4
6	12	2	4	2
7	8	3	4	2
8	10	3	5	3
9	12	3	6	4