บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 การผลิตน้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานโดยการระเหยน้ำคั้นจากต้นสดข้าวฟ่างหวาน ส่วนที่ 2 การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นต้นสดข้าวฟ่างหวานและน้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 และส่วนที่ 3 การหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยเชื้อรา *T. reeseei* RT-P1 และส่วนที่ 4 การหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานแบบรวมปฏิกิริยาด้วย *T. reeseei* RT-P1 และ *S. cerevisiae* RT-P2 พันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 3 พันธุ์ คือ พันธุ์คราวเลย์ (Cowley) เคลเลอร์ (Keller) และเรย์ (Wray)

3.1 ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำคั้น สารละลายน้ำเชื่อมข้นและต้นสดข้าวฟ่างหวาน

3.1.1 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำคั้นต้นสดข้าวฟ่างหวาน

น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานได้ผ่านกรองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสเพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำข้าวฟ่างหวานโดยใช้วิธีดังต่อไปนี้ คือ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol – Sulfuric [8] ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Somogyi – Nelson [8] ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ด้วยวิธี Micro Kjeldalh method ปริมาณของแข็งทั้งหมดด้วย Refractometer และวัดความเป็นกรด – ด่าง ด้วย pH meter

3.1.2 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวาน

ลดความเข้มข้นของน้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานจาก 68-74 องศาบริกซ์เหลือ 20 องศาบริกซ์ นำไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ด้วยวิธี Kjeldalh method และความหนาแน่น

3.1.3 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบต้นสดข้าวฟ่างหวาน

นำต้นสดข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 ถึง 1.5 เซ็นติเมตร ได้นำมาใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ตามวิธีการทดลองของ TAPPI 203 om – 88 [13] เถ้าด้วยวิธี TAPPI 211 om – 85 [14] ความชื้นด้วยวิธี TAPPI 210 om – 86 [15] โปรตีนด้วยวิธี Kjedahl Method [16] และลิกนิน ด้วย TAPPI 222 om – 88 [17]

3.2 การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

3.2.1 วัตถุดิบ

น้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์และเคลเลอร์ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี (ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี) ก่อนนำไปทำการหมักต้องผ่านการกรอง วัด

และปรับค่าพีเอช น้ำตาลเริ่มต้นที่ค่าประมาณ 18 องศาบริกซ์ ทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ 120°C นาน 15 นาที

3.2.2 จุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ดังรูปที่ 3.1

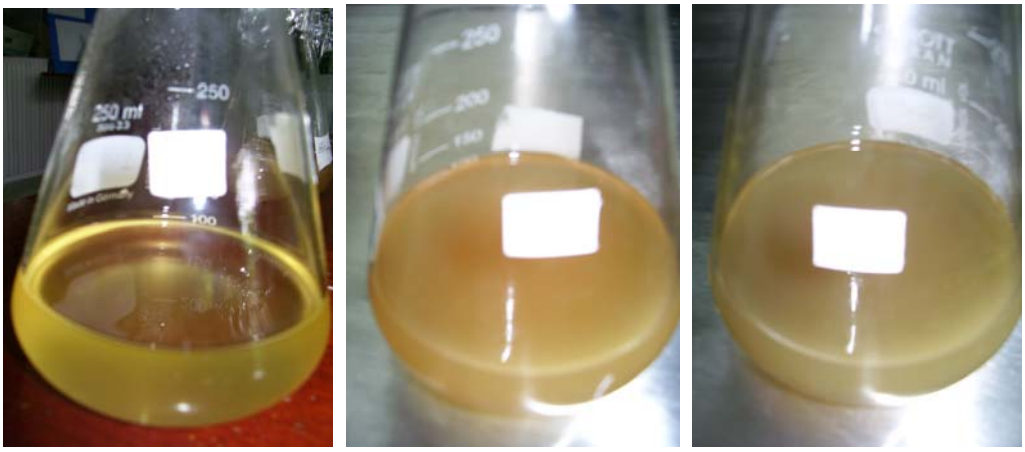
รูปที่ 3.1 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

3.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงต้นเชื้อจุลินทรีย์

อาหารแข็งสูตรวายเอ็มเอ (YMA) สำหรับเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ประกอบด้วยยีสต์เอ็กซ์-แทร็ค 3.0 กรัม มอลล์เอ็กซ์แทร็ค 3.0 กรัม เบคโต - เปปโตน 5.0 กรัม กลูโคส (glucose) 20.0 กรัม เอการ์ 20.0 กรัม และน้ำกลั่น 1.0 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้ด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 120°C ความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำอาหารวายเอ็มเอเทลงในจานเพาะเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ ใช้ลูพที่สะอาดนำยีสต์จากหลอดวุ้นเอียงเขี่ยลากลงบนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน จะได้เชื้อยีสต์กระจายบนอาหารแข็งวายเอ็มเอเป็นโคโลนีเดี่ยว

3.2.4 อาหารเหลวสำหรับผลิตหัวเชื้อยีสต์

อาหารเหลวสำหรับผลิตหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 มี 2 ชนิด คือ อาหารเหลวสูตร YM ประกอบด้วยสารเคมีเหมือนสูตรอาหารวายเอ็มเอ ยกเว้นไม่มีเอการ์ และอาหารเหลวสูตรSW ประกอบด้วยสารละลายผสมจากการใช้น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์แทนน้ำกลั่นสำหรับเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วยกรดซิตริก (citric acid) 21.0 กรัมในน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานปริมาตร 1 ลิตร (สารละลายกรด) และสารประกอบไดโซเดียม ไฮโดรเจน ออโธฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 71.6 กรัม ในน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานปริมาตร 1 ลิตร (สารละลายเบส) จากนั้นนำสารละลายกรดและเบสมาผสมกันในอัตราส่วนเท่ากับ 3:10 โดยปริมาตร วัดพีเอชของสารละลายผสมด้วยพีเอชมิเตอร์ ถ้าค่าพีเอชของสารละลายผสมมีค่าไม่เท่ากับ 5 ให้เติมสารละลายกรดหรือเบสลงไปจนได้กระทั่งได้พีเอชตามต้องการ



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 3.2 (ก) อาหารเหลวสูตร YM (ข) อาหารเหลวสูตรSWJ-1 (ค) อาหารเหลวสูตร SWJ-2

3.2.5 น้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานที่ใช้เป็นสับสเตรท

น้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานที่ใช้สำหรับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 คือน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ที่ไม่ได้ปรับพีเอชใช้แทนด้วย SWJ-1 และที่ได้ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 5 ใช้แทนด้วย SWJ-2 น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์ที่ได้ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 5 ใช้แทนด้วย SWJ-3 น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานทั้ง 3 ชนิดต้องทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้ในการหมักเอทานอล

3.2.6 วิธีการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ แบ่งออกเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 โดยนำยีสต์ 1 โคโลนีจากจานเพาะเชื้อใส่ลงในอาหารเหลวที่ปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 32°C

ขั้นตอนที่ 2 การหาปริมาณหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 และพีเอชเหมาะสม แบ่งการทดลองเป็น

วิธีการทดลอง 2 ก การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน SWJ-1 ที่มีความหวานเริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ด้วยหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 5 10 15 และ 20 โดยปริมาตร ตามลำดับ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 32°C เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) [18] เอทานอลด้วยเครื่องอีบูลิโอมิเตอร์ [19] และน้ำหนักเซลล์แห้ง [20] ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นและทุก 8 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง 2 ข ปรับพีเอชน้ำคั้นข้าวฟ่างหวาน SWJ-1 ที่ความหวานเริ่มต้น 18 องศาบริกซ์ให้เท่ากับ 3.5 4.0 4.5 และ 5.0 ด้วย 0.1N สารละลายกรดซัลฟิวริก และหรือ 0.1N สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้ปลอดเชื้อก่อนทำการหมักด้วยปริมาณหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 ที่เหมาะสมซึ่ง

ได้จากวิธีการทดลอง 2 ก ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย 32°C เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอสเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นและทุกๆ 8 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 เปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ที่ไม่ได้ปรับพีเอช (SWJ-1) และได้ปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม (SWJ-2) ด้วยปริมาณหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 ที่เหมาะสมในอาหารเหลวสูตร YM โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยน้ำคั้นแต่ละชนิดในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย (32°C) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นและทุก 4 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลาหมัก 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 4 เปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์และเคลเลอร์ที่ได้ปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมด้วยปริมาณหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 ที่เหมาะสมในอาหารเหลวสูตร SW โดยเลี้ยงยีสต์ด้วยน้ำคั้นแต่ละชนิดในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเฉลี่ย (32°C) เก็บตัวอย่างวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นและทุก 2 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง

3.3 การผลิตน้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานโดยการระเหยน้ำคั้นสด

3.3.1 เครื่องระเหยถังสแตนเลส 2 ชั้น

เครื่องระเหยเป็นถังสแตนเลส 2 ชั้นที่ใช้จุดศูนย์กลางร่วมกัน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 40 และ 60 เซ็นติเมตร สูง 90 เซ็นติเมตร มีระบบควบคุมอุณหภูมิของน้ำซึ่งบรรจุอยู่รอบถังนอก โดยตั้งค่าอุณหภูมิควบคุมไว้ที่ 98 °C ถังด้านในบรรจุน้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานที่ต้องการระเหย พร้อมทั้งมีใบกวนความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที ใช้แก๊สหุงต้มซึ่งอยู่ก้นถังเป็นจุดให้ความร้อน

3.3.2 วิธีการทดลองด้วยเครื่องระเหยถังสแตรเลส 2 ชั้น

นำต้นสดข้าวฟ่างหวาน ดังรูปที่ 3.3 มาคั้นโดยใช้เครื่องบีบ จากนั้นจึงนำน้ำคั้นสดข้าวฟ่างหวานประมาณ 40 ถึง 80 กิโลกรัม ใส่ลงในเครื่องระเหย ดังรูปที่ 3.4 ชั่งน้ำหนักแก๊สวัดความหวาน (องศาบริกซ์) ก่อนและหลังการระเหยด้วยรีแฟรกโตมิเตอร์ ดังรูปที่ 3.5 บันทึกเวลาการทดลองจนกระทั่งได้น้ำเชื่อมข้นที่ความหวานตามต้องการ ดังรูปที่ 3.6

3.3.3 การระเหยด้วยกระทะเหล็กปากกว้าง

กระทะเหล็กปากกว้างมีขนาดความกว้าง 90 เซ็นติเมตร ความจุประมาณ 30 ลิตร ตั้งบนเตาก่อด้วยอิฐ ใช้ไม้ฟืนเป็นแหล่งให้พลังงานความร้อน

3.3.4 วิธีการทดลองการระเหยด้วยกระทะเหล็กปากกว้าง

เทน้ำคั้นข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการกรองเศษกากชานข้าวฟ่างออกเรียบร้อยแล้ว จำนวน 20 ลิตร (ประมาณ 22 กิโลกรัม) ที่ความหวาน 19 องศาบริกซ์ ลงในกระทะ ใช้ไม้พายกวนตลอดเวลาหลังจาก

(ก)

(ข)

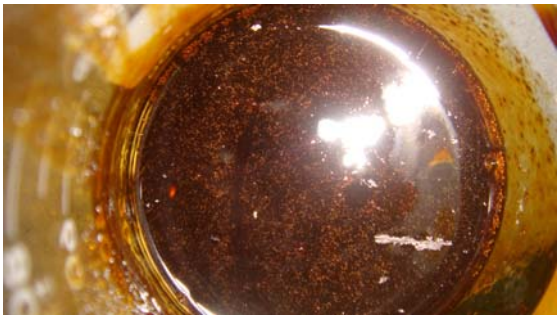
(ค)

รูปที่ 3.3 (ก) ต้นสดข้าวฟ่างหวาน (ข) ขั้นตอนการคั้นน้ำข้าวฟ่างหวาน
(ค) น้ำคั้นข้าวฟ่างหวานก่อนการระเหย

รูปที่ 3.4 เครื่องระเหยถังสแตนเลส 2 ชั้น

รูปที่ 3.5 รีแฟรกโตมิเตอร์สำหรับวัดความหวาน

(ก)



(ข)

รูปที่ 3.6 (ก) น้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานระหว่างการระเหย (ข) น้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวานหลังการระเหย

เดือดและช้อนฟองออกเป็นระยะๆ บันทึกความหวานเริ่มต้นและสิ้นสุด เวลาที่ใช้ทดลอง น้ำหนักน้ำเชื่อมข้นที่ได้ และปริมาณฟืนที่ใช้

3.4 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

3.4.1 สูตรอาหารเหลวมี 3 สูตร คือ

อาหารเหลวสูตร-1 LM-NP0 (ไม่ได้เติมสารอาหารใดๆ พิ่ม) ประกอบด้วยสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานปริมาตร 1 ลิตร ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ที่ผ่านการกรองและปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

อาหารเหลวสูตร-2 LM-NP11 (N:P เท่ากับ 1:1) ประกอบด้วย

$MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.5068 กรัม

ปุ๋ยยูเรีย (46% NH_4SO_4) เท่ากับ 0.214 กรัม

ฟอสเฟต (NPK: 0-52-34) เท่ากับ 0.107 กรัม

สารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานที่ความหวาน 20 องศาบริกซ์เท่ากับ 1 ลิตร

อาหารเหลวสูตร-3 LM-NP21 (N:P เท่ากับ 2:1) ประกอบด้วย

$MgSO_4.7H_2O$ เท่ากับ 0.5068 กรัม

ปุ๋ยยูเรีย (46% NH_4SO_4) เท่ากับ 0.428 กรัม

ฟอสเฟต (NPK: 0-52-34) เท่ากับ 0.1073 กรัม

สารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานที่ความหวาน 20 องศาบริกซ์เท่ากับ 1 ลิตร

อาหารเหลวทั้ง 3 สูตรต้องผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ 120°C นาน 15 นาที และปรับพีเอชเท่ากับ 5 ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อและใช้เป็นสับสเตรทในการหมักเอทานอล

3.4.2 สารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานความเข้มข้นเริ่มต้น 20 องศาบริกซ์

น้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวาน 3 พันธุ์ คือ เรย์ เคลเลอร์ และ คาวเลย์ ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 68 ถึง 78 องศาบริกซ์ ดังรูปที่ 3.7 (ก)

วิธีการเตรียมสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานพันธุ์เรย์ เคลเลอร์ และ คาวเลย์ ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ต้องทราบความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำเชื่อมข้นแต่ละพันธุ์ คำนวณปริมาณน้ำเชื่อมข้นที่ต้องการใช้ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ ทดสอบสารละลายด้วยรีแฟร็กโตมิเตอร์ จากนั้นต้องนำมากรอง จึงนำมาเติมปุ๋ยยูเรียและฟอสเฟตเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ปริมาณเท่ากับในอาหารเหลวแต่ละสูตร และปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วในหม้อ

นึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานที่ได้แต่ละพันธุ์นำไปใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเอทานอล ดังรูปที่ 3.7 (ข)

(ก)

(ข)

รูปที่ 3.7 (ก) น้ำเชื่อมข้นข้าวฟ่างหวาน (ข) สารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวาน

3.4.3 จุลินทรีย์

ต้นเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 ใช้ผลิตหัวเชื้อได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.4.4 อาหารเพาะเลี้ยงต้นเชื้อจุลินทรีย์

ใช้วิธีการเหมือนวิธีการทดลอง 3.2.3

3.4.5 การผลิตหัวเชื้อยีสต์จากอาหารเหลว

นำอาหารเหลวแต่ละสูตรซึ่งมีความหวานเริ่มต้นเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ กรองสารละลายที่ได้และปรับพีเอชให้เท่ากับ 5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 จำนวน 1-2 โคโลนีจากจานเพาะเชื้อใส่ลงในอาหารเหลวแต่ละสูตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีและวางขวดรูปชมพู่บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.6 วิธีการหมักเอทานอลด้วยหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

วิธีการทดลองทำได้โดยนำหัวเชื้อยีตส์จากข้อ 3.4.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เทลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตรซึ่งมีสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานแต่ละสูตรซึ่งเตรียมได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำสำลีมาปิดปากขวดจากนั้นนำไปวางบนเครื่อง

เขย่าด้วยอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30°C ดังรูปที่ 3.8 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล และน้ำหนักเซลแห้งตั้งแต่เวลาเริ่มต้นของการหมัก และทุก 8 ชั่วโมงนาน 88 ชั่วโมง

รูปที่ 3.8 การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวาน

3.5 การหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานด้วยครูดเซลลูเลสผงเพียงอย่างเดียว

การหมักเอทานอลจากต้นข้าวฟ่างหวานด้วยครูดเซลลูเลสผงที่ผลิตจาก *T. reeseei* RT-P1 ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักโดยใช้วิธีการทดลองออร์โธโกนอล ได้แก่ ปริมาณต้นสดข้าวฟ่างหวานซึ่งใช้เป็นสับสเตรท ความเข้มข้นของเชื้อราผงแห้ง และระยะเวลาหมัก โดยที่กำหนดตัวแปรคงที่คือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ปริมาตรอาหารเหลวเท่ากับ 100 มิลลิลิตร และอุณหภูมิห้อง (30°C)

3.5.1 ต้นสดข้าวฟ่างหวานที่ใช้เป็นสับสเตรทและ*อาหารเหลวสูตร-4*

ต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์ และคาวเลย์ ซึ่งผ่านการตัด ขนาด 0.5 ถึง 1.5 เซ็นติเมตร และ*อาหารเหลวสูตร-4* [21] ประกอบด้วย 1 กรัมต่อลิตร $CaHPO_4$, 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$, 8 กรัมต่อลิตร ปุ๋ยยูเรีย (46% NH_4SO_4), 15 กรัมต่อลิตร ปุ๋ยฟอสเฟต (N:P:K เท่ากับ 0:52:34), และน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5 ต้องนำมาผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนทำการหมักเอทานอล ดังรูปที่ 3.9

3.5.2 จุลินทรีย์จากการหมักแข็ง

จุลินทรีย์ที่ใช้คือไตรโคเดอร์มา ริสิอี RT-P1 สำรับผลิตครูดเซลลูเลสผง [21] จากการหมักแข็งบนกากมันสำปะหลังด้วยไตรโคเดอร์มา รีสิอีจากจานอาหารวุ้นแข็งพีดีเอ (potato dextrose agar) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงจากห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราช-มงคลธัญบุรี ปทุมธานี ดังรูปที่ 3.10

(ก) (ข)

รูปที่ 3.9 สับสเตรทต้นสดข้าวฟ่างหวาน (ก) พันธุ์คาวเลย์ และ (ข) พันธุ์เคลเลอร์

รูปที่ 3.10 ครูดเซลลูเลสผง (เชื้อราไตรโคเดอร์มารีสิอี RT-P1)

3.5.3 วิธีทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวาน

การหมักเหลวเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานโดยใช้ครูดเซลลูเลสผงจากไตรโคเดอร์มารีสิอี RT-P1 ซึ่งผลิตได้จากกระบวนการหมักแข็งเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอลโดยใช้ต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์คาวเลย์ และเคลเลอร์ กำหนดปัจจัยควบคุม 3 พารามิเตอร์ แบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระยะเวลาที่ใช้หมัก 1, 3, 5, 7 และ 9 วัน ความเข้มข้นของเชื้อราเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 % โดยน้ำหนักแห้งและต้นสดข้าวฟ่างหวานเท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 % โดยน้ำหนักเปียก การหมักเหลวเอทานอลทำในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตรกับอาหารเหลว pH 5 ปริมาตรคงที่ 100 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (32°C) ดังรูปที่ 3.11 เก็บตัวอย่างวัดความเข้มข้นจุลินทรีย์ของแต่ละการทดลอง นำผลการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ได้ไปคำนวณตามวิธีการทดลองออร์โธโกนอลจึงจะได้สภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 3.11 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักแบกะด้วยวิธีการทดลองออร์โธโกนอล

3.5.4 วิธีทดลองการหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานสภาวะที่เหมาะสม

เหมือนวิธีการทดลอง 3.5.3 ยกเว้นใช้ปริมาณต้นสดข้าวฟ่างหวาน ครูดเซลลูเลสผงเท่ากับค่าที่ได้จากสภาวะเหมาะสมที่ได้จากวิธีการทดลอง 3.5.3 เก็บตัวอย่างวิเคราะห์เอทานอล การเติบโตของจุลินทรีย์ น้ำตาลรีดิวซ์ ทุกวันเป็นเวลา 12 วัน

3.5.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

ตัวอย่างจากการหมักต้นสดข้าวฟ่างหวานแต่ละพันธุ์ ดังรูปที่ 3.12 ถูกนำไปวิเคราะห์ หาความเข้มข้นของจุลินทรีย์จากการวัดเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้เฮมาไซโต-มิเตอร์ (Boeco, Germany) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส [18] และเอทานอลด้วยวิธีการเกิดเอทานอลจากการออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์ด้วยไดโครเมตที่ละลายในกรดซัลฟิวริก [22] โดยวัดค่าการดูดกลืนจากเครื่อง UV-visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 600 nm ตามลำดับ

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการหมักต้นสดข้าวฟ่างหวานแต่ละพันธุ์

3.6 การหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานแบบรวมปฏิกิริยาด้วยครูดเซลลูเลสผง (*T. reeseei* RT-P1) ร่วมกับหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2

การหมักเอทานอลจากต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์เคลเลอร์ และคาวเลย์ แบบรวมปฏิกิริยาด้วยครูดเซลลูเลสผง (*T. reeseei* RT-P1) และร้อยละ 10 โดยปริมาตรของ *S. cerevisiae* RT-P2 ทำการทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากวิธีการทดลอง 3.5 มีขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

3.6.1 วัตถุดิบและอาหารเหลว

เตรียมต้นสดข้าวฟ่างหวานพันธุ์คาวเลย์ เคลเลอร์และอาหารเหลวสูตร-4 ทำให้ปลอดเชื้อตามปริมาณที่ต้องการซึ่งได้จากการทดลอง 3.5

3.6.2 หัวเชื้อยีสต์

เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* RT-P2 [23] ตามสูตรอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลปีบ 200 กรัม, $MgSO4.7H_2O$ 0.51 กรัม, ยูเรีย 0.22 กรัมและปุ๋ยฟอสเฟต 0.11 กรัม ในน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร และทำให้ปลอดเชื้อ หลังจากเย็นลง นำยีสต์ 1-2 โคโลนีต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ปิดจุกด้วยสำลีวางบนเครื่องเขย่า นาน 24 ชั่วโมง

3.6.3 ครูดเซลลูเลสผง

ชั่งครูดเซลลูเลสผง (เชื้อราไตรโคเดอร์มารีสิอี RT-P1) ตามต้องการ นำไปใส่ในอาหารเหลวสูตร-4 ในขวดสำหรับเตรียมอาหารเหลว (จุกสีฟ้า) ผสมให้เข้ากันและให้เชื้อราปรับสภาพกับอาหารเหลวด้วยแท่งกวนแม่เหล็กนาน 30 นาที

3.6.4 การหมักเอทานอลแบบรวมปฏิกิริยา

นำต้นสดข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรตามด้วยอาหารเหลวสูตร-4 ที่มีครูดเซลลูเลสผงผสมในอัตราส่วนปริมาณต้นสดต่ออาหารเหลวซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการทดลอง 3.5.3 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อยีสต์ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการทดลอง 3.6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยสำลี วางขวดบนเครื่องเขย่าอัตราเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดความเข้มข้นของเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และจุลินทรีย์ทุกวัน