บทที่ 3
วัสดุที่ใช้ในการวิจัยและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 มันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) จัดซื้อจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ตัวอย่างแป้งที่ได้จะถูกเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

มันเส้น (Cassava chip) จัดซื้อจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ซึ่งมันเส้นที่ได้จะถูกนำมาลดขนาดด้วยการบด โดยใช้ Cross-Beater mill (Glen Mill Crop., Maywood) ที่มีตะแกรงร่อนขนาด 0.2 mm และมันเส้นที่ผ่านการลดขนาดแล้วจะนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

กากมัน (Cassava pulp) รับมาจากบริษัทแป้งโคราชจำกัด จังหวัดนครราชสีมาประเทศไทย ทั้งนี้กากมันที่ได้มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 60-70% จึงต้องนำไปอบไล่ความชื้นที่ 55°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปบดและร่อนผ่านตระแกรงขนาด 0.2 mm กากมันที่ผ่านการลดขนาดแล้วจะนำไปเก็บในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

3.1.2 สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

กากยีสต์สดซึ่งปริมาณของแข็งแขวนลอยประมาณ 18-20% ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทขอนแก่นบริวเวอรี่ จำกัด จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย จะถูกเตรียมตามวิธีการของ Saksinchai *et al.* (2001) โดมเริ่มจากนำสารละลายกากยีสต์มาเจือจางด้วยน้ำที่ปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณของแข็งแขวนลอยเท่ากับ 15% (w/v) จากนั้นนำไป Autolysate ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบ 20 ชั่วโมง ทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85°C คงไว้นาน 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เหลืออยู่ทั้งหมดของเอนไซม์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปแยกเซลล์ยีสต์ออกด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 rpm นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum evaporator) (NESLAB Instrument, Inc., USA) ที่ 60°C ความดัน 300 mbar ตอนสุดท้ายนำสารละลายไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง Spray dryer (GEA NIro, Denmark) โดยใช้อุณหภูมิขาเข้าที่ 180°C และอุณหภูมิขาออกที่ 90°C ตามลำดับ สารสกัดจากยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ที่ได้จะนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นก่อนนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.3 แบคทีเรีย

ในการศึกษานี้ได้ใช้แบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งจัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยแบคทีเรียที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงให้เกิดการสร้างสปอร์ดังจะได้กล่าวในหัวข้อ 3.2.4 ซึ่งสารละลายสปอร์ที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และจะใช้เป็นกล้าเชื้อตลอดทั้งการทดลอง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อผลิตตัวทำละลายเอบีอี (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) จะใช้อาหาร P2 medium ตามรายงานของ Madihah *et al.* (2001b) ซึ่งมีองค์ประกอบตามตารางข้างล่างนี้

	Chemical	**Concentration (g/L)**
Buffer:	KH_2PO_4	0.75
	K_2HPO_4	0.75
	CH_3COONH_4	2.2
Minerals:	$MgSO_4.7H_2O$	0.4
	$MnSO_4.H_2O$	0.01
	$FeSO_4.7H_2O$	0.01
	NaCl	1.0
Vitamins:	*p*-aminobenzoic acid	0.001
	Biotin	0.0008
	Yeast extract	5.0

อาหาร P2 medium จะใช้ในทุกการทดลอง ซึ่งจะนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาทีและตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะเติมวิตามิน (*p*-aminobenzoic acid และ Biotin) ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง (Sterilized membrane Filter) ขนาด 0.2 μm

3.1.5 สารเคมีที่ใช้

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบจากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงดังตารางข้างล่างนี้

Chemical reagents	**Company**
Agar	VECHAVIT, THAILAND
Ammonium acetate	MERCK, GERMANY
α-Amylase	SIGMA-ALDRICH, THAILAND
Biotin	FLUKA, CHINA
Cooked meat medium	FLUKA, CHINA
Dipotassium hydrogen phosphate	AJAX, AUSTRALIA
Dinitrosalicylic acid	FLUKA, SWITZERLAND
Ferrous sulphate heptahydrate	AJAX, AUSTRALIA
Glucoamylase	SIGMA-ALDRICH, THAILAND
Glucose	FLUKA, SWITZERLAND
Malachite green oxylate	AJAX, AUSTRALIA
Manganese sulphate, monohydrate	AJAX, AUSTRALIA
Magnesium sulphate heptahydrate	FLUKA, SWITZERLAND
Maltose	FLUKA, CHINA
p-aminobenzoic acid	AJAX, AUSTRALIA
Potassium dihydrogen phosphate	FLUKA, CHINA
Reinforced clostridia agar	AJAX, AUSTRALIA
Sodium chloride	VECHAVIT, THAILAND
Sodium hydroxide	J.K. BAKER, USA
Sulfuric acid	FLUKA, CHINA
Yeast extract	VECHAVIT, THAILAND

3.1.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือทั้งหมดที่ใช้เพื่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยวัตถุดิบจากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 แสดงดังรายการข้างล่างนี้

Equipment	**Company**
Analytical balance	PRESICA, USA
Autoclave model ACV-3167	HIRIYAMA, JAPAN
Gas chromatograph	KONIK, SPAIN
High performance liquid chromatography	AGILENT, JAPAN
Hot air oven	MEMMERT, GERMANY
Hot plate	GIBTHAI, THAILAND
Incubator	EN400 NUVE, TURKEY
Laminar air flow cabinet	AUGUSTA, THAILAND
Micropipette 100,1000,5000 μL	BRAND, GERMANY
pH meter	CONSORT, SWITZERLAND
Rotary evaporator vacuum	NESLAB, U.S.A.
Refrigerated centrifuge super TT21	SORVALL, USA
Spectrophotometer	ANALYTIK JANA, THAILAND
Spray dryer	GEA NIRO, DENMARK
Vortex mixer	VORTEX-2-GENIE, TAIWAN
Hammer miller	CROMTON, USA

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของมันสำปะหลัง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ไขมัน เส้นใย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปริมาณความชื้น) ของตัวอย่างแป้งมัน มันเส้น และกากมันจะวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ทั้งนี้ปริมาณไขมัน เส้นใยและเถ้า จะวิเคราะห์ตามรายงานของ Charles *et al.* (2005) ส่วนปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จะวิเคราะห์ตามรายงานของ Vadivel and Janardhanan, (2001)

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

3.2.2.1 แป้งมัน (Cassava starch) และมันเส้น (Cassava chip)

ในการย่อยตัวอย่างแป้งมัน และมันเส้นจะใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ α-Amylase (Sigma-Aldrich) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งมี Activity เท่ากับ 12,000 U/mL และเอนไซม์ Glucoamylase (Sigma-Aldrich) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Aspergillus niger* และมี Activity เท่ากับ 6,000 U/mL สำหรับวิธีการย่อยตัวอย่าง จะเริ่มจากละลายตัวอย่างมันสำปะหลัง 90 g ในน้ำ 400 mL จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase ปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

3.2.2.2 กากมัน (Cassava pulp)

สำหรับการย่อยตัวอย่างกากมันโดยใช้เอนไซม์นั้น จะเริ่มละลายกากมัน ในอัตราส่วนกากมัน 1 g ต่อน้ำ 4 mL แล้วเติมเอนไซม์ Cellulase (Spezyme CP, Genencor, USA, 5000 U/mL) ปริมาณ 1.41 U/mL เพื่อทำการย่อยโครงสร้างของ Cellulose จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, 12,000 U/mL) ปริมาณ 0.3% (v/v) ที่ pH 6.0 แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 0.5% (v/v) ที่ pH 4.5 แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

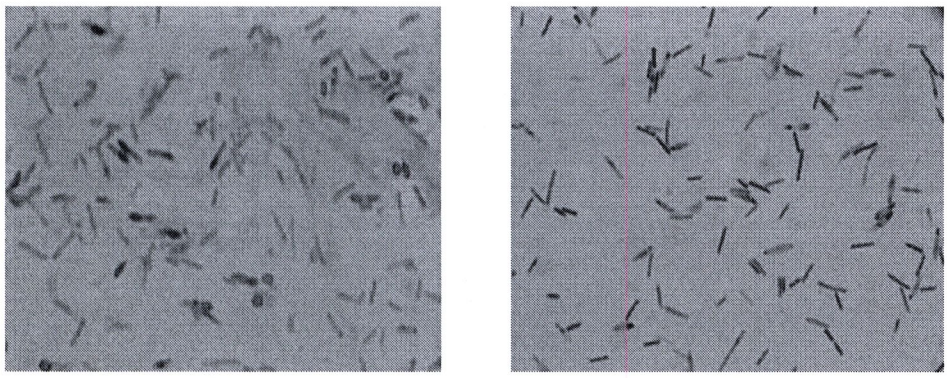
3.2.3 การเตรียมมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยกรด

การเตรียมกากมันโดยการย่อยด้วยกรด จะดัดแปลงการเตรียมตามวิธีของ Thongchul *et al.* (2010) ซึ่งจะใช้กรดไฮโดรคลอลิกเจือจาง 1 mol/L (ตัวอย่างกากมัน 1 g ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 1 mol/L ปริมาณ 9 mL) โดยจะนำตัวอย่างสารละลายที่เติมกรดแล้วไปให้ความร้อนที่ 121°C นาน 15 นาทีในหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) จากนั้นนำตัวอย่างไปกรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH 10 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงส่วนที่ตกตะกอนออกโดยใช้ความเร็วรอบ 1,500 rpm นาน 15 นาที หลังจากนั้นปรับ pH ด้วยกรดให้ได้ pH 6.0 ตามด้วยปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่ตกตะกอนออกอีกครั้ง สุดท้ายนำ

ตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย ด้วยวิธี DNS (Jesse *et al.*, 2002) ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (ดูรายละเอียดการวิเคราะห์ในหัวข้อที่ 3.3.4)

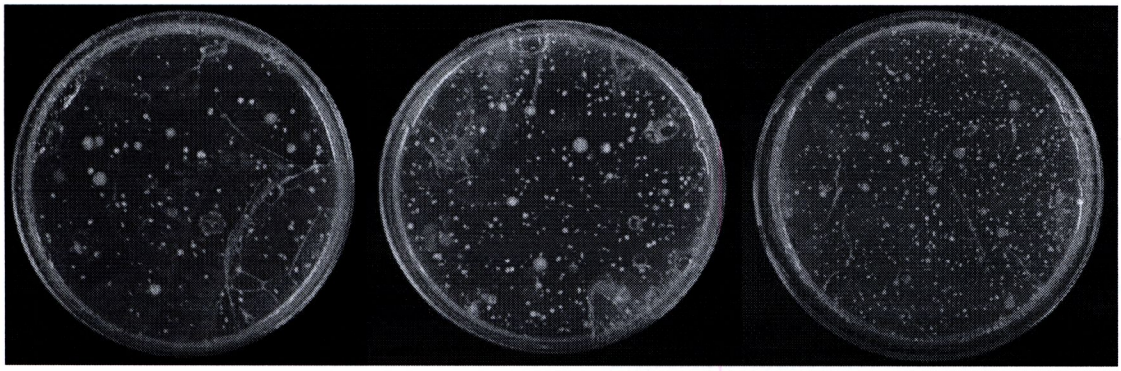
3.2.4 การเตรียมสปอร์ของแบคทีเรีย Clostridia และการเก็บรักษา

แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ที่ใช้จะนิยมเก็บรักษาไว้ในรูปสารละลายสปอร์ (Spore suspension) ในน้ำ ดังนั้นจึงต้องทำการเตรียม Stock ของสปอร์เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากนำสารละลายสปอร์ 0.2 mL จาก stock มากระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ใน 20 mL ของอาหาร Cooked meat (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) ที่เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 g/L ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วยการกระตุ้นในสารละลายน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 1.5 นาที จากนั้นจึงนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นการสร้างแก๊สเกิดขึ้นอย่างรุนแรง (Vigorous gassing) จากนั้นใช้ Loop แตะเชื้อที่ได้จากข้างต้นไป Streak ลงบน Slope ของ Reinforced Clostridial Agar (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มในโถไร้อากาศ (Anaerobic jar) ในตู้บ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 45 วัน หลังจากนั้นใช้น้ำกลั่นเข้าไปละลายสปอร์ของเชื้อที่สร้างขึ้นบน Slant ของ Reinforced Clostridial Agar แล้วบรรจุลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเล็ก หลอดละ 2 mL ทำการนับสปอร์ด้วยเครื่องวัดเซลล์เม็ดเลือดแดง (Haemocytometer) ปริมาณสปอร์ที่ใช้ควรมีจำนวนอยู่ระหว่าง 1.0×10^{7} ถึง 1.0×10^{8} spores/mL จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักต่อไป ทั้งนี้จะตรวจสอบลักษณะของสปอร์โดยการย้อมตามวิธีของ Bartholomev และ Mittwer, (1950) ซึ่งใช้ Malachite green เป็นสีย้อมก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 นอกจากนี้ก่อนนำสารละลายสปอร์ไปใช้เพื่อเป็นกล้าเชื้อนั้น จะทำการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ก่อนการใช้งานโดยการทำ Pour plate ในอาหาร Cooked Meat Agar (ดูองค์ประกอบในภาคผนวก ก) แล้วบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในถังเพาะไร้อากาศ ดังแสดงในภาพที่ 3.2



(a) (b)

ภาพที่ 3.1 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า (a) แสดงสีเขียวของเซลล์สปอร์ที่ติดสีของ Malachite green (b) แสดงลักษณะแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (Rod-shaped) จาก Gram's stained



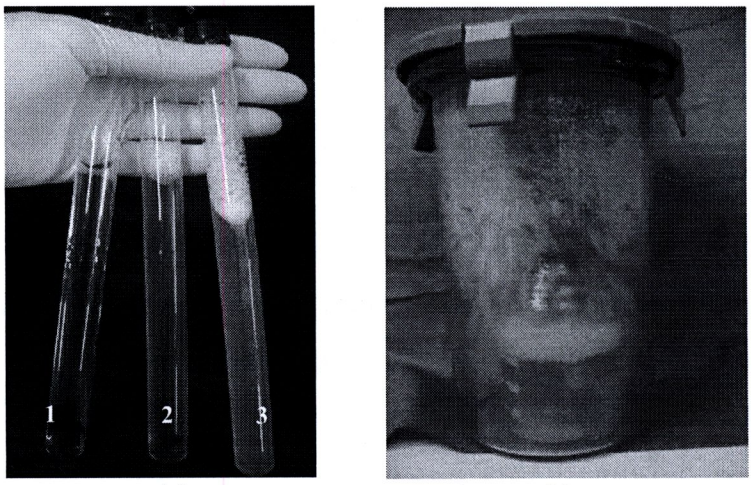
(a) (b) (c)

ภาพที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ได้จากการ Pour plate ของสารละลายสปอร์ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากการบ่มที่ 35°C นาน 24 ชั่วโมง (a) ใช้สารละลายสปอร์ปริมาณ 0.2 mL (b) ใช้สารละลายสปอร์ปริมาณ 0.5 mL และ (c) สารละลายสปอร์ปริมาณ 1.0 mL

3.2.5 การเตรียมกล้าเชื้อ

วิธีการเตรียมกล้าเชื้อ จะเริ่มจากนำสารละลายสปอร์ 0.2 mL จาก stock ใส่ลงในอาหาร Cooked meat ปริมาตร 20 mL ที่เสริมด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 g/L แล้วนำกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วยการกระตุ้นในสารละลายน้ำแข็งต่ออีก 1.5 นาที จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 17-18 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเห็นการสร้างแก๊สเกิดขึ้นอย่างรุนแรง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 2 mL ลงในขวด 100 mL ที่มีอาหารสำหรับจะใช้ใน

กระบวนการหมักขั้นต่อไป ก่อนจะนำไปบ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลาประมาณ 17-18 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อหลังจากการบ่มเพาะครั้งที่สองนี้ จะถูกใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักต่อไป โดยจะใช้ที่ปริมาตร 10% (v/v) ดังภาพที่ 3.3



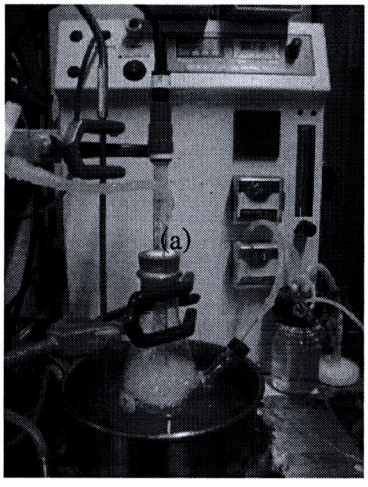
(a) (b)

ภาพที่ 3.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากสารละลายสปอร์ (a) 20 mL ของอาหาร Cooked meat ก่อนการเติมเชื้อ (หลอดหมายเลข 1) หลังจากเติมเชื้อ (หลอดหมายเลข 2) ขณะเจริญเติบโตเต็มที่ (หลอดหมายเลข 3); (b) อาหารเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาด 100 mL หลังจากการบ่มเพาะที่ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.2.6 สภาวะของกระบวนการหมัก

3.2.6.1 การหมักในขวดทดลอง (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 mL

สำหรับการหมักในขวดนั้นใช้ขวดทดลองขนาด 250 mL ที่มีลักษณะของส่วนที่คล้ายแขนยื่นออกมา ดังภาพที่ 3.4 เพื่อรักษาระบบให้เป็นระบบปิด จะปิดฝาขวดด้วย Butyl rubber ส่วนด้านที่เป็นแขนยื่นออกมาจะปิดด้วย Rubber septum และจะถ่ายเชื้อหรือสุ่มตัวอย่างด้วยเข็มที่ปลอดเชื้อ เพื่อรักษาสภาวะไร้ออกซิเจนของขวดไว้ตลอดเวลา ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุลงในขวดดังกล่าว จะถูกนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะไล่ออกซิเจนในขวดออกด้วยแก๊สไนโตรเจน เพื่อให้เกิดสภาวะไร้อากาศซึ่งเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ โดยทุกการทดลองในการศึกษานี้จะหมักที่อุณหภูมิ 35°C และจะใช้ความเร็วรอบในการหมุนที่ 100 rpm สำหรับตัวอย่างที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมัก



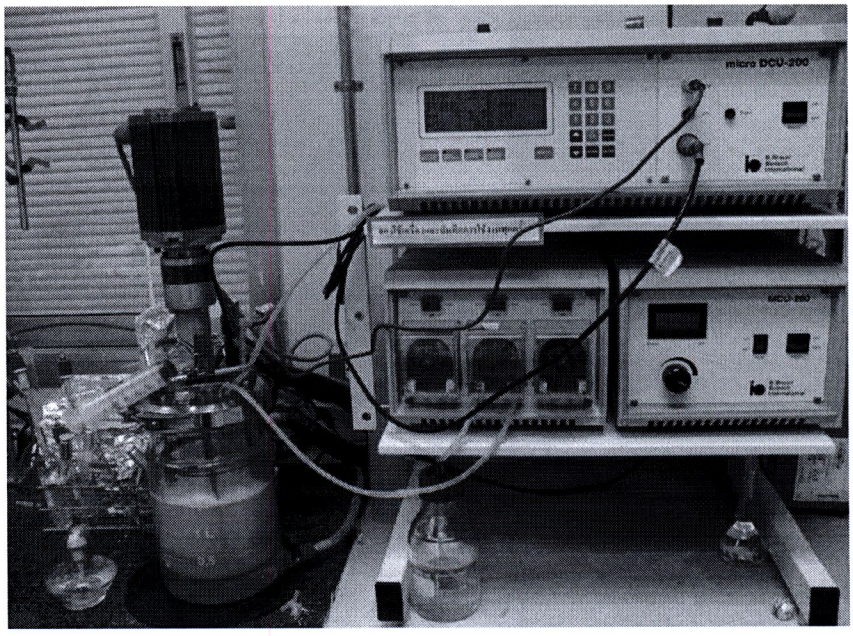
(a)

(b)

ภาพที่ 3.4 การหมักด้วยขวดทดลองขนาด 250 mL (a) การหมักที่มีควบคุมค่า pH (b) การหมัก ที่ไม่มีการควบคุมค่า pH

3.2.6.2 การหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L

ในการทดลองนี้ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L ที่เป็นชนิดพื้นฐานทั่วๆ ไป ซึ่งเป็นแก้วสองชั้น (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, New Jersey, USA) โดยจะใช้ปริมาตรในการหมัก (Working volume) 1.5-L และสามารถควบคุมค่า pH ของน้ำหมักได้อัตโนมัติ (ภาพที่ 3.5) ทั้งนี้ในการทดลองที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ของน้ำหมักจะใช้ 3M KOH เพื่อรักษาระดับของ pH ก่อนการเติมกล้าเชื้อทุกครั้งจะทำการไล่อากาศภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้แก๊สไนโตรเจนพ่นใส่ที่ผิวหน้าของอาหาร (Surface flushing) เพื่อให้ได้สะภาวะไร้ออกซิเจน และหลังจากเติมเชื้อลงในปฏิกรณ์ชีวภาพแล้ว จะทำการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนอย่างต่อเนื่องจนกว่าแบคทีเรียจะโตได้ดีและสร้างแก๊สเองได้ จึงจะหยุดการให้แก๊สไนโตรเจน



ภาพที่ 3.5 การหมักด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2-L สำหรับการทดลองที่ควบคุมค่า pH ของน้ำหมัก

ในการศึกษานี้จะใช้วัตถุดิบที่ได้จากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลัก เพื่อผลิตตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตน และเอทานอล ในกระบวนการหมักแบบกะด้วยแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ซึ่งวิธีการทดลองทั้งหมดของการศึกษานี้ จะประกอบด้วย 4 ส่วนหลักๆ ดังนี้

1) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการควบคุมค่า pH ต่างๆ ในระหว่างการหมัก ซึ่งการทดลองนี้จะประยุกต์ใช้การควบคุมค่า pH ของน้ำหมักในระยะที่มีการสร้างตัวทำละลาย (Solventogenic phase) ตามวิธีการของ Mahihah *et al.* (2008) โดยควบคุมค่า pH ที่ pH 4.5-6.5 (4.5, 5.0, 5.2, 5.5, 6.0 และ 6.5) (pH เริ่มต้น 6.5) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 g/L เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย

2) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการใช้วัตถุดิบจากมันสำปะหลังชนิดต่างๆ (แป้งมัน กากมัน มันเส้น และตัวอย่างมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดและเอนไซม์)โดยใช้ที่ความเข้มข้น 50 g/L ร่วมกับการใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจนด้วย

3) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นต่างๆ ของแหล่งอาหารคาร์บอน ซึ่ง Mahihah *et al.* (2008) และ Lee *et al.* (2008) ได้รายงานว่าช่วงความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะกับการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* sp. มากที่สุดจะอยู่ในช่วง 20-80 g/L ดังนั้น การทดลองนี้จะศึกษาความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนของแบคทีเรีย *Cl. acetobutylicum* TISTR 1462 ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 20-80 g/L โดยใช้ 5 g/L สารสกัดจากยีสต์ทางการค้าเป็นแหล่งไนโตรเจน

4) การทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของการใช้แหล่งไนโตรเจน ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) และสารสกัดจากยีสต์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Spent brewer's yeast extract)

ทุกการทดลองจะเติมสารละลายวิตามิน (*p*-aminobenzoic acid 0.001 g/L + Biotin 0.0008 g/L) เมื่ออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการทำให้ปลอดเชื้ออยู่ในช่วง 34-37°C ในระหว่างการหมักจะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 35°C และควบคุมความเร็วรอบในการหมุนที่ 100 rpm เพื่อป้องกันการตกตะกอนของอาหาร สำหรับตัวอย่างที่จำเป็นต้องควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมัก จะใช้สารละลาย 3M KOH ทั้งนี้ทุกการทดลองใช้กล้าเชื้อที่ความเข้มข้น 10% (v/v) และในระหว่างการหมักจะสุ่มตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วันเพื่อตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก

3.3 วิธีการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ตัวอย่างที่ได้ในระหว่างการหมักจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียและส่วนใสก่อนจะนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3.1 การหาความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย

ความเข้มข้นของเซลล์ (1 g เซลล์แห้งต่อ 1 mL ของน้ำหมัก) ในกรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในการหมักสามารถหาได้โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (Assobhei *et al.*, 1998) (ดูสมการความสัมพันธ์ในภาคผนวก ข) ส่วนกรณีที่ใช้วัตถุดิบที่เป็นแป้ง จะหาปริมาณเซลล์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tang *et al.* (2010) โดยมีวิธีการคือ เติมเอนไซม์ α-amylase (Sigma-Aldrich) ซึ่งมี Activity เท่ากับ 12,000 U/mL ปริมาณ 20 μL ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 1 mL ที่บรรจุอยู่ในหลอด Eppendorf ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปบ่มที่ 90°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งที่เหลืออยู่ออกก่อน จากนั้นนำหลอด Eppendorf ดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำ 1 mL เข้าไปแทน หลังจากนั้นนำหลอด Eppendorf ที่มีเฉพาะเซลล์แบคทีเรียไปอบให้แห้งที่ 105°C เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่แท้จริง

3.3.2 การวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ทุกตัวอย่างที่ต้องวัดค่า pH ของน้ำหมัก จะวัดโดยใช้เครื่องวัด pH รุ่น E520 (Metrohm A.G., Hersau, Switzerland) ที่ผ่านการ calibrated ด้วยบัฟเฟอร์ pH 4.0 และ pH 7.0 ก่อนใช้งานทุกครั้ง

3.3.3 การย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสี DAPI และ PI

ในการทดลองนี้จะวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของแบคทีเรีย โดยอาศัยความสามารถในการซึมผ่านของสี DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma-Aldrich) และ PI (Propidium iodide) (Sigma-Aldrich) ซึ่งสี DAPI จะมีความสามารถในการจับกับ DNA ของแบคทีเรียทุกชนิดทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในขณะที่สี PI จะใช้บ่งบอกความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ของแบคทีเรีย เนื่องจากสี PI ไม่มีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ในกรณีที่เซลล์แบคทีเรียเป็นปกติ แต่ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายหรือถูกทำลาย สี PI จะเข้าสู่เซลล์และจะไปจับกับกรดนิวคลิอิกได้ (Carneiro *et al.*, 2009; Pablos *et al.*, 2011) ดังนั้นจึงอาศัยความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสีย้อมทั้ง 2 ชนิด เพื่อบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียได้ ทั้งนี้สารละลาย DAPI จะเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยละลาย DAPI 5 mg ในน้ำปลอดเชื้อ 5 mL ที่มีสารละลาย 2.5% Glutaraldehyde และสารละลาย PI จะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/1mL เช่นกัน โดยละลาย PI 25 mg ในน้ำปลอดเชื้อ 25 mL สำหรับวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างจะเริ่มจากเติมสารละลาย DAPI และ PI จาก Stock ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาณ 80 µL ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 4 mL จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะนำไปกรองด้วย Polycarbonate membrane ขนาด 0.22 µm จากนั้นนำกระดาษกรองที่ได้ไปวางลงบนกระจกสไลด์ (Glass slide) และปิดด้วย Cover slip ก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (Leica DMI 4000B microscope) ที่ติดตั้งอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดการเรืองแสง (Fluorescence attachment ebq-100 mc-L) และกล้องถ่ายรูป (Canon Power Shot S80) ในการนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียจะสุ่มนับจากจุดที่ต่างกัน 3 จุดในกระดาษกรอง พร้อมทั้งถ่ายรูปความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ย้อมด้วยสี DAPI/PI โดยค่าความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อม DAPI จะอยู่ระหว่าง 340-380 nm และจะมีค่า Suppression ของแสงที่ 425 nm ส่วนค่าความยาวคลื่นที่สามารถมองเห็นเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อม PI จะอยู่ระหว่าง 515-560 nm และจะมีค่า Suppression ของแสงที่เหมาะสมที่ 590 nm

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก

การหาปริมาณความเข้มของของตัวทำละลายอินทีย์ (แอซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ที่ได้จากกระบวนการหมัก จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Madihah *et al.*, (2008) โดยใช้เครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งมี Detector ชนิด FID (Flame ionization detector) ตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกแยกด้วยคอลัมน์ ชนิด Capillary column ความยาว 30 m ขนาด 30 m × 0.25 mm โดยมีแก๊สไฮโดรเจนเป็นตัวพา (Carrier gas) ด้วยอัตราการไหล 1.5 mL/นาที ทั้งนี้อุณหภูมิของคอลัมน์จะถูกตั้งไว้ที่ 115°C นาน 8 นาที ก่อนที่จะเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ 170°C ด้วยอัตรา 5°C/นาที และคงอุณหภูมิที่

170°C นาน 10 นาที ส่วนอุณหภูมิของ Detector และ Injector จะถูกตั้งไว้ที่ 270 และ 220 °C ตามลำดับ การฉีดตัวอย่างแต่ละครั้งจะใช้ปริมาณ 2 µL

ปริมาณน้ำตาล (กลูโคสและมอลโตส) ที่ได้จากการกระบวนการย่อย รวมทั้งกรดอินทรีย์ (บิวทิริกและอะซิติก) จะวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) (Model 1200 series, Agilent technology, Japan) โดยใช้ Detector ชนิด RI (Refractive index) น้ำตาลและกรดอินทรีย์จะแยกโดยใช้ คอลัมน์ชนิด An ion exclusion (BIO RAD, Aminex, HPX-87H, USA) โดยตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 45°C และใช้ 4 mM H_2SO_4 เป็น Mobile phase ด้วยอัตราการไหล 0.4 mL/นาที

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้งในตัวอย่างที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบนั้น จะวิเคราะห์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Tang *et al.* (2010) โดยเติมเอนไซม์ α-Amylase ปริมาณ 20 µL ลงในตัวอย่างน้ำหมัก 1 mL แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C นาน 3 ชั่วโมง เพื่อย่อยแป้งให้กลายเป็น dextrin ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ หลังจากนั้นเติม 8,880 µL ของอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ก่อนจะเติมเอนไซม์ Glucoamylase ปริมาณ 100 µL แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 58°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 mL นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง HPLC และคำนวณปริมาณแป้งตามสมการข้างล่างนี้

ปริมาณแป้ง (g/L) = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (g/L) X 10^a X 0.9^b

เมื่อ a คือค่าการเจือจางตัวอย่าง และ b คือค่าความสัมพันธ์ของแป้งที่สามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสได้

3.3.5 การวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์

ค่าอัตราการผลิตสารละลายอินทรีย์ทั้งหมดในกระบวนการหมักแบบกะ (Productivity; g/L/h) จะคำนวณโดยใช้ผลรวมของความเข้มข้นของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอล หารด้วยเวลาในการหมักที่ทำให้ได้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด ส่วนค่าผลผลิตที่ได้ (Yield; g product/g sugar consumed) ของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอลนั้น จะคำนวณจากปริมาณผลรวมของความเข้มข้นของตัวทำละลาย บิวทานอล แอซิโตนและเอทานอล หารด้วยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไปเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์