บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์

1. *Saccahromyces* sp. (S1) จากโรงงานผลิตเหล้า
2. *Saccahromyces burgundy* (Sb) จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา
3. *Saccahromyces cerevisiae* (S3) จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา
4. ยีสต์ที่แยกจากโรงงาน ตะวันออกเคมีคัล ประเทศไทยจำกัด (TC)

สารเคมี

1. DNS Reagent (3,5 Dinitrosalicylate Reagent)
2. $(NH_4)_2SO_4$
3. Urea $(CO(NH_2)_2)$
4. NaCl
5. HCl
6. NaOH

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast Peptone Dextrose (YPD)
2. Potato Dextrose Agar (PDA)
3. น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (Saccharified Cassava Starch, SCS)
4. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract, Y)
5. แป้งถั่วเหลือง (Soy Flour, SF) ตรา ดอยคำ (ผลิตภัณฑ์โครงการหลวง) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.5)
6. น้ำสกัดจากแป้งถั่วเหลือง (Soy Liquor, SL) (ภาคผนวก ก ข้อ 2.4)

เครื่องมือทดลอง

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC CINTRA 40, GBC Scientific Equipment pty Ltd., Australia
2. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Culture Incubator) รุ่น CONTERM MITE 4000 SERIES

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น C25KC Classic Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co., Inc, U.S.A.

4. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Micro Centrifuge) รุ่น Micro Centrifuge (MSE) SANYO

5. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) รุ่น PRE VINUM J.SALLERON DUJARDIN PARIS

6. แก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chormatography) รุ่น UNICAM Pro GC

7. แคพิลารี่ คอลัม โครมาโตกราฟี (Capillary Column) รุ่น AT™-AQUAWAX, Alltech Associates; Inc,. U.S.A. ยาว 30 เมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร มีขนาด Film Thickness 0.25 ไมโครเมตร

8. ถังหมัก (Fermenter) BIOSTAT® B B.Braun, Biotech International, Germany ขนาด 5 ลิตร มีใบกวนแบบ Disc Rushton Turbine เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร 6 ใบกวน จำนวน 2 ชุด

9. เครื่องวัด pH (pH Meter) DENVER BASIC, DERVER Instrument Company, U.S.A.

10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง CP3202S Sartorius, Sartorius AG., Germany.

11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง CP224S Sartorius, Sartorius AG., Germany.

12. เพอริสทอลติค ปั๊ม (Peristaltic Pump) 323S/D, WATSON MAROW BREDEL, U.K.

13. เครื่องผสม (Vortex Mixer) MS1, KIKA Works (Asia) Sdn., Bhd.

14. ตู้อบ (Hot Air Oven) model 500D 0601, Memmert GmbHt Co., KG.

15. ไมโครปิเปต (Micropipet) Model GILSON

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

1.1 นำยีสต์ตั้งต้นที่เก็บไว้ในสภาวะแช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลาย จากนั้นถ่ายยีสต์ลงไปในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose Broth (YPD) บรรจุอยู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 175 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

1.2 ถ่ายยีสต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (SCS) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100

มิลลิลิตร ที่ได้ทำการปรับค่าพีเอช (pH) เป็น 5.0±0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีการเขย่า

1.3 นำน้ำหมักมาทำการวัดปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องมือ Ebulliometer (ภาคผนวก ข ข้อ 2) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (S) ด้วยวิธี DNS Method (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 4) แล้วนำมาคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

1.3.1 ความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร (V) มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% (v/v)) วัดได้จากเครื่องมือ Ebulliometer (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

1.3.2 ความเข้มข้นของเอทานอลโดยน้ำหนัก (P) มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร (g/l) คำนวณได้ดังนี้

$$P = (V \times 10) \times 0.7851$$

1.3.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ(S) มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l) วัดด้วยวิธี DNS method (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

1.3.4 ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (S_{used}) มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l) คำนวณโดย

$$S_{used} = S_{int} - S$$

S_{int} คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก กรัมต่อลิตร (g/l)

1.3.5 น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (X) มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (g/l) วัดด้วยวิธี Cell Dry Weight (ภาคผนวก ข ข้อ 4)

1.3.6 ผลผลิตเอทานอล (Ethanol Yield, Yp/s) มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมต่อลิตร (g/g/l) คำนวณได้ดังนี้

$$Yp/s = (P / S_{used})$$

1.3.7 ผลผลิตมวลเซลล์ (Yx/s) มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมต่อลิตร (g/g/l) คำนวณได้ดังนี้

$$Yx/s = (X / S_{used})$$

1.3.8 ปริมาณเอทานอลที่ได้เทียบกับทฤษฎี (Percentage of Theoretical Yield, E_T) คำนวณได้ดังนี้

$$E_T = \{P/(S_{used} \times 0.511) \times 100\}$$

ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร (V) ที่สูงที่สุดไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การศึกษาปัจจัยของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้

2.1 ทำการเพิ่มจำนวนยีสต์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1

2.2 ถ่ายยีสต์ตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุสารละลาย SCS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการปรับค่าพีเอช (pH) เป็น 5.0±0.1 โดยมีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ แป้งถั่วเหลือง และน้ำแป้งถั่วเหลืองที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร โดยมีชุดทดลองควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสารละลาย SCS ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาวะไม่มีการเขย่า

2.3 นำน้ำหมักมาทำการวัดความเข้มข้นเอทานอล โดยใช้เครื่องมือ Gas Chromatography (ภาคผนวก ข ข้อ 3) วัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ด้วยวิธี DNS Method (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และวัดการเจริญโดยการหาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 4) แล้วนำมาคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยวิธีวัดเดียวกับข้อ 1.3 ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร สูงที่สุดไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

3. การหมักเอทานอลแบบแบตช์ (Batch Fermentation) โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร

3.1 ทำการเพิ่มจำนวนยีสต์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 แต่ใช้ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาตร 300 มิลลิลิตรแทน

3.2 ถ่ายสารละลายยีสต์ทั้งหมดในข้อ 3.1 ลงในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรในการหมักทั้งหมดเท่ากับ 3 ลิตร โดยประกอบด้วยสารละลาย SCS เป็นแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2,670 มิลลิลิตร และ เติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อที่ 2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไป ทำการหมักแบบแบตช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ควบคุม pH ที่ระดับ 4.5 มีการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ คือ กวนด้วยความเร็วรอบ 50, 100, 200 และ 400 รอบต่อนาที ส่วนชุดทดลองควบคุมใช้สารละลาย SCS ที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่จะไม่มีการการกวน

3.2 เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักแห้ง และคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.3 ทำการคัดเลือกสภาวะการหมักที่ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตรสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองข้อต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การหมักเอทานอลแบบเฟดแบตช์ (Fed-Batch Fermentation) โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร

4.1 ทำการเพิ่มจำนวนยีสต์ตามขั้นตอนในข้อ 3.1

4.2 ถ่ายสารละลายยีสต์ทั้งหมดในข้อ 4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรในการหมักเริ่มต้นเท่ากับ 1 ลิตร ประกอบด้วยสารละลาย SCS มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 670 มิลลิลิตร และ เติมแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมที่คัดเลือกได้จากการทดลองข้อ 2 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไป ทำการหมักแบบแบตช์เป็นเวลา 6 ชั่วโมงโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH ที่ระดับ 4.5

4.3 ทำการเติมอาหาร (Feed Medium) ที่ประกอบด้วยสารละลาย SCS ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ลงไป โดยมีการแปรผันอัตราการเติมอาหารแบบทวีคูณ (Exponential Feed) ในช่วงแรกของการหมัก และทำการเติมอาหารแบบคงที่ (Constant Feed) ในช่วงหลังของการหมัก ที่เวลา 10 ชั่วโมงโดยคำนวณอัตราการเติมอาหาร (Feed Rate, F) จากสมการ $F=F_0e^{\mu t}$ โดยสามารถคำนวณอัตราการเติมอาหารได้ดังต่อไปนี้

4.3.1 ปรับอัตราการเติมอาหารจากสมการ $F=F_0e^{\mu t}$ โดยให้ $\mu=\mu_{max}$ และทำการปรับความเร็วในการเติมอาหาร 3 ครั้ง ที่เวลาในการหมัก 6, 8 และ 10 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเติมเท่ากับ 0.1002, 0.1145 และ 0.1309 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

4.3.2 ปรับอัตราการเติมอาหารจากสมการ $F=F_0e^{\mu t}$ โดยให้ $\mu=2/3\mu_{max}$ และทำการปรับความเร็วในการเติมอาหาร 3 ครั้ง ที่เวลาในการหมัก 6, 8 และ 10 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเติมเท่ากับ 0.0589, 0.0654 และ 0.0706 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

4.3.3 ให้อัตราการเติมอาหารจากสมการ $F=F_0e^{\mu t}$ โดยให้ $\mu=1/3\mu_{max}$ และทำการปรับความเร็วในการเติมอาหาร 3 ครั้ง ที่เวลาในการหมัก 6, 8 และ 10 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเติมเท่ากับ 0.0388, 0.0413 และ 0.0441 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ทำการเติมอาหารลงไปจนมีปริมาตรในการหมักทั้งหมดเป็น 3 ลิตร หมักนาน 72 ชั่วโมง สำหรับชุดการทดลองควบคุม จะใช้ชุดการทดลองควบคุมในการผลิตเอทานอลแบบแบตช์โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตรแทน

หมายเหตุ

F_0 คือ อัตราการเติมอาหารที่เวลาเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 0.067

e คือ Exponential

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ

t คือ เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

μ_{max} คือ อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในสภาวะ Static หาค่าได้จากภาคผนวก ข ข้อ 5

4.4 เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาวัดปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักแห้ง และคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 2.3 ทำการคัดเลือกสภาวะการหมักที่ให้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตรสูงที่สุด

5. การจัดจำแนกยีสต์ที่คัดเลือกได้

ทำการเพิ่มจำนวนยีสต์ตามขั้นตอนในข้อ 1.1 มาศึกษาลักษณะสัญฐานวิทยาของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วนำมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มขยายยีน 18S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose Gel Electrophoresis) แล้วจึงทำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ GenBank จาก National Center for Biotechnology Information Server(NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn (ภาคผนวก ค)

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ คือ ความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร ความเข้มข้นเอทานอลโดยน้ำหนัก อัตราผลผลิตเอทานอล อัตราผลผลิตเซลล์ยีสต์ ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และเปอร์เซ็นต์เอทานอลที่ได้เทียบกับทฤษฎี จากการหมักเมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ แป้งถั่วเหลือง และน้ำแป้งถั่วเหลือง ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1, 2, 4 และ 8 กรัมต่อลิตร วางแผนการทดลองแบบ All Fixed Factor หรือแบบ Factorial โดยทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบหลายทาง (Multiple Factor ANOVA) แล้วทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของของพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยใช้การทดสอบหลังการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Post Hoc Comparison) โดยทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Multiple Comparison) แบบ Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 11.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University