บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. **จุลินทรีย์**

   ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5088

2. **อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์** (ภาคผนวก ก)

   2.1 Yeast Malt extract medium (YM)

   2.2 Yeast extract-Peptone-Cassava medium (YPC)

3. **วัตถุดิบ**

   แป้งมันสำปะหลัง ตราปลาไทย 5 ดาว ของบริษัท อี.ที.ซี. เอี้ยงตงจั่น จำกัด

4. **สารเคมี** (ภาคผนวก ข)

   4.1 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

   4.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

   4.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

   4.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ Thin-layer chromatography (TLC)

   4.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (GC)

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
2. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
5. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
6. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s
7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Technical Cooperation รุ่น U-2000
8. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex mixer) ยี่ห้อ LAB-Line รุ่น 1297
9. เครื่องหมุนเวี่ยง (centrifuge) ชนิดควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR20B
10. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON
11. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography-Flame ionization detector; GC-FID) ยี่ห้อ HEWLETT PACKARD รุ่น HP 6850
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044

13. อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า โดยการซื้อจากหาบเร่แผงลอยและร้านขายยาโบราณในท้องที่จังหวัดภาคใต้ โดยเก็บตัวอย่างลูกแป้งใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส

2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์จากลูกแป้ง

นำตัวอย่างลูกแป้งมาบดให้เป็นผง โดยใช้โกร่งที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ตัวอย่าง 1 กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Yeast extract-Peptone-Cassava broth (YPC broth) (Reddy, *et al*., 1996) ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 0.05 เปอร์เซ็นต์ Peptone 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกเชื้อราซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมลอยอยู่ในอาหารออก โดยการกรองด้วยสำลีปลอดเชื้อ นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองไปเจือจาง จนตัวอย่างมีความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} ปิเปตตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-3}-10^{-6} ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร YPC agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ทึบแสงที่มีลักษณะแตกต่างกันออกมาให้มากที่สุด จากนั้นย้ายเชื้อยีสต์ที่เลือกได้ไปยังอาหาร YPC agar ในอาหารใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปแยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ศึกษาต่อไป โดยเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร YM agar ผิวหน้าเอียงในหลอดทดลอง แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุกๆ 3 เดือน

3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อยีสต์ที่ได้จากลูกแป้ง

3.1 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งบนอาหารแข็ง

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง (จากข้อ 2) เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร YPC agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วราดด้วยสารละลายไอโอดีน (Lugal's iodine) ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายออก สังเกตบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น แล้วนำมาหาประสิทธิภาพของการย่อยแป้งจาก อัตราส่วนขนาดของบริเวณวงใสต่อขนาดของโคโลนี คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี

3.2 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งในอาหารเหลว

เขี่ยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง (จากข้อ 3.1) ลงในอาหาร YPC broth นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีที่สุด

3.3 การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล

เขี่ยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง (จากข้อ 2) ลงในอาหาร YM broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารหมักปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังจากเชื้อยีสต์

4.1 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อจะทำโดยเขี่ยเชื้อจากข้อ 3.2 ลงในอาหาร YPC broth ปริมาตร100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

4.2 ผลของปริมาณแป้งเริ่มต้น

นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงในอาหาร YPC broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด

4.3 ผลของแหล่งไนโตรเจน

นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงในอาหาร YPC broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนคือ yeast extract, peptone, ammonium sulphate และ yeast extract ผสมกับ peptone ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด เปรียบอัตราการเจริญและการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์กับอาหารที่ไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนลงไป

4.4 ผลของอุณหภูมิเริ่มต้น

นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงในอาหารที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, และ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด

4.5 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

นำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงในอาหารที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเป็น 4.5, 5.5 และ 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ยีสต์ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุดที่ได้จากข้อ 4.4 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาค่าพีเอชที่ทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด เปรียบอัตราการเจริญและการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์กับอาหารที่ไม่ได้ปรับค่าพีเอช

4.6 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นคือ 3, 5, 7 และ10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหารที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจน ที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารซึ่งได้คัดเลือกได้จากข้อ 4.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.4 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด

4.7 ผลของความเร็วรอบของการเขย่า

ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้ผลจากข้อ 4.6 ใส่ลงในอาหารที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารซึ่งได้คัดเลือกได้จากข้อ 4.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 4.4 เขย่าที่ความเร็ว 100, 150 และ200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช อัตราการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อหาความเร็วรอบของการเขย่าที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีที่สุด

4.8 การศึกษาการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังจากเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและปรับสภาวะต่างๆ ที่ได้จากข้อ 4.2-4.7 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณโปรตีน ปริมาณแป้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และผลผลิตที่ได้จากย่อยแป้งมันสำปะหลัง เพื่อหาระยะเวลาที่เชื้อยีสต์ผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด

5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์

5.1 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ

เขี่ยเชื้อจากข้อ 3.3 ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อนี้ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

5.2 ผลของอุณหภูมิเริ่มต้น

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อหาอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

5.3 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 11 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 4.5, 5.5 และ 6.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อหาค่าพีเอชของอาหารที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

5.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีปริมาณน้ำกลูโคสต่างๆ กันคือ 11, 18, 22 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

5.5 ผลของปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดเริ่มต้น

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร YM broth ที่มีปริมาณน้ำกลูโคส (ผลจากข้อ 5.4) ซึ่งเติมปริมาณยีสต์สกัด (yeast extract) ที่ต่างๆ กันคือ 0.3, 0.7, 1.0 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดเริ่มต้นที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

5.6 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นคือ 3, 5, 7 และ10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสและปริมาณยีสต์สกัดซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 5.4 และ 5.5 ตามลำดับ และปรับสภาวะต่างๆ ที่ได้ผลจากข้อ 5.1-5.2 ข้างต้น เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ทำให้เชื้อยีสต์ผลิตปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด

5.7 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 มาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและปรับสภาวะต่างๆ ที่ได้จากข้อ 5.2-5.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ กันคือ 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง Ebulliometer เพื่อหาระยะเวลาที่เชื้อยีสต์ผลิตเอทานอลได้สูงสุด

6 การหากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง

หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังจากเชื้อยีสต์ในข้อ 3.2 และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ในข้อ 3.3 แล้วจึงนำเชื้อยีสต์ที่ได้ไปศึกษาหากระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ดังต่อไปนี้

6.1 ขั้นตอนในการเตรียมหัวเชื้อ

6.1.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.2

เขี่ยเชื้อจากข้อ 3.2 ลงในอาหาร YPC broth ปริมาตร100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อนี้ตามผลจากข้อ 4.6 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

6.1.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.3

เขี่ยเชื้อจากข้อ 3.3 ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาณเชื้อนี้ตามผลจากข้อ 5.6 เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

6.2 การหมักแบบใช้เชื้อร่วม (coculture)

ใส่เชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 6.1.1 และ 6.1.2 ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบเหมือนกับในข้อ 5.7 แต่ใช้แป้งมันสำปะหลังแทนน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตามผลจากข้อ 4.2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าพีเอชตามผลจากข้อ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิตามผลจากข้อ 4.4 บ่มเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมตามที่ได้ผลในข้อ 4.8 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณแป้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณเอทานอลโดยวิธีการ GC-FID โดยเปรียบเทียบกับการหมักแบบใช้เชื้อเดี่ยว (monoculture)

6.3 การหมักแบบแยกกระบวนการหมัก (two-stage)

ในระยะแรกเป็นขั้นตอนการย่อยแป้ง โดยใส่เชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 6.1.1 ลงในอาหารและสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมเหมือนกับข้อ 4.8 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ระยะที่สองเป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำแป้งหมักที่ได้ขั้นต้น โดยใส่เชื้อที่ได้จากข้อ 6.1.2 ลงในน้ำแป้งหมักที่เติมสารอาหารเหมือนข้อ 5.7 ยกเว้นน้ำตาลกลูโคส แล้วนำไปปรับค่าพีเอชตามผลที่ได้จากข้อ 5.3 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ระยะเวลาการบ่มตามผลที่ได้จากข้อ 5.7 นำมาวิเคราะห์หาปริมาณแป้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีน และปริมาณเอทานอลโดยวิธีการ GC-FID

7 การจำแนกชนิดของยีสต์ (Classification of yeasts)

นำเชื้อยีสต์จากลูกแป้งที่มีคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติผลิตแอลกอฮอล์ที่ดี ไปศึกษาการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization) และการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiological characterization) โดยดัดแปลงวิธีของ Barnett และคณะ (2000) แล้วจัดส่งให้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นผู้ทำการพิสูจน์เชื้อยีสต์ในระดับสปีชีส์ โดยการทำ 26S rDNA จำนวน 500 basepair โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย TE-buffer 2 ครั้ง และดูดตะกอนเซลล์ที่ได้มา 0.5 ไมโครลิตร แล้วใส่ 10xPCR buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร primer NL1 ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ NL4 ปริมาตร 7 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 69.5 ไมโครลิตร และ Taq DNA polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปทำ PCR amplification โดยทำ 35 cycles ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที เมื่อสิ้นสุดการทำ PCR amplification แล้ว นำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (Biosystems GeneScan 3700, Foster City, CA) และนำลำดับเบสของ 26S rDNA ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลในอินเตอร์เน็ตโดยใช้เวปไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

วิธีการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ค)

1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
2. การวิเคราะห์หาปริมาณแป้งที่เหลือ
3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน
4. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์
5. การหาปริมาณเอทานอลโดยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี
6. การวิเคราะห์หาผลผลิตที่ได้จากย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาจะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design , CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 14.0