บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 4 ลิตร แบบ KMJ-2-B ของ Mituwa Rikagaku kogyo Co., Japan

1.2 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Industrial Analyzer YSI Model 27) ของ Yellow Springs Instrument Co., U.S.A.

1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Spectronic 21) ของ Bausch & Lomb

1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Digital pH meter, o 31 pH meter) ของ Beckman

1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) แบบ 201 ของบริษัทซิกมา

2. <u>เคมีภัณฑ์</u>

2.1 แป้งมันสำปะหลัง (Cassava Starch) ตราปลามังกร ผลิตโดยโรงงานแป้งมัน ไทยทำ ชลบุรี

2.2 บิวทานอล (n-Butanol) ของบริษัท May & Baker, อังกฤษ

2.3 อาซีโตน (Acetone) ของบริษัท BDH Chemicals, อังกฤษ

2.4 เอธานอล (Ethanol absolut) ของบริษัท Carlo Erba, อิตาลี

2.5 กรดอะเซติก (Acetic acid) ของบริษัท Carlo Erba, อิตาลี

2.6 กรดบิวทีริค (Butyric acid) ของบริษัท Merck

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การคัดแยก (Screening) คลอสตริเดียมที่ผลิตบิวทานอลจากตัวอย่างดิน

3.1 สถานที่และการเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินรวม 60 ตัวอย่าง จากดินในแหล่งทั่วไปในเขตกรุงเทพมหานคร และจังหวัดใกล้เคียง ดินในไร่มันสำปะหลัง โดยเก็บตัวอย่างดินที่อยู่ลึกประมาณ 5-10 นิ้ว ใส่ในถุงพลาสติก

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ (Enrichment)

ใช้วิธีการของ Calam (29) นำตัวอย่างดินอย่างละ 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารโพเตโต เด็กโตรส บรอท 10 มล. (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) นำไป heat shock โดยจุ่มหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำเดือดนาน 2 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงโดยแช่ในน้ำเย็น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.3 การตรวจสอบปริมาณบิวทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเชื้อจากหลอดอาหารในข้อ 3.2 มา 5 มล. ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) อัตราการหมุน 5,000 rpm. 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มล. ใส่ในหลอดขนาดเล็ก หยดสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 หยด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล อาซีโตน และเอธานอล โดยโครมาโตกราฟฟีแก๊ส (ดูข้อ 6.)

3.4 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษาเชื้อ

3.4.1 ใช้ลูป (Loop) จุ่มของเหลวในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบว่าให้ปริมาณบิวทานอลสูง นำไปลาก (Streak) บนจานเลี้ยงเชื้อ (Petridish) ที่

บรรจุอาหารโพเตโต เด็กโตรส อาการ์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) บ่มใน Anaerobic jar อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.4.2 ตรวจดูโคโลนี สุ่มเอาโคโลนีในแต่ละจานเลี้ยงเชื้อ ไปทดสอบความสามารถในการผลิตบิวทานอลอีกครั้งในอาหารโพเตโต เด็กโตรส บรอท เช่นเดียวกับข้อ 3.2 และข้อ 3.4

3.4.3 ทำเชื้อให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test) โคโลนีที่ให้ปฏิกิริยาลบ จะเก็บรักษาไว้ในอาหารโพเตโต เด็กโตรส บรอท และในอาหาร Reinforced Clostridial medium (ภาคผนวก ก. หมายเลข 4) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-4 วัน ให้เชื้อสร้างสปอร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

4. <u>การเลี้ยงคลอสตริเดียมในอาหารแป้งมันสำปะหลังในหลอดทดลอง</u>

ใช้ลูปถ่ายเชื้อคลอสตริเดียมที่เก็บไว้ในข้อ 3.4.3 ลงในอาหารแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) บรรจุในหลอดทดลอง 10 มล. นำไปทำ heat shock ในน้ำเดือด 1 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณอาซีโตน บิวทานอล และเอธานอล ตามวิธีการในข้อ 3.2 และข้อ 6.

5. <u>การเลี้ยงคลอสตริเดียมเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากอาหารแป้งมันสำปะหลังในถังหมัก</u>

คลอสตริเดียมสายพันธุ์ 8p-2 เป็นสายพันธุ์ที่ทดสอบว่าให้ผลผลิตเป็นบิวทานอลสูงสุดในอาหารแป้งมันสำปะหลัง จะนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอาซีโตน-บิวทานอลในถังหมัก

เลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียม สายพันธุ์ Bp-2 ตามวิธีการในข้อ 4. อายุเชื้อ 3-4 วัน จากนั้นนำมาทำ heat shock ในน้ำเดือดนาน 1 นาที ถ่ายเชื้อในหลอดทดลองลงในขวดแก้วทรงกรวยสำหรับเลี้ยงเชื้อ บรรจุอาหารแป้งมันสำปะหลัง 200 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับเป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) ถ่ายเชื้อจากขวดแก้วทรวงกรวยลงในถังหมัก ในถังหมักบรรจุอาหารแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) 2 ลิตร อัตราการกวนเป็น 100 rpm. ปรับอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส และควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5-6.5

6. <u>การวิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริค โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแก๊ส</u>

ใช้โครมาโตกราฟฟีแก๊สของ Shimadzu Model Gc 7AG กับ recorder integrator ของ chromatopac CR1A เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลาย (บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล) และกรดบิวทิริคและกรดอะเซติก

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

คอลัมน์ยาว 2 เมตร ขนาด 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย porepak Q 80-100 mesh อุณหภูมิของคอลัมน์ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector) 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector) 300 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สในโตรเจน 50 มล.ต่อนาที ปริมาณของผลิตภัณฑ์หาได้จากการเทียบกับพื้นที่ใต้นิค (peak) ของสารที่ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบ (external standard) โดยที่ บิวทานอล อาซีโตน เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริค มีรีเทนชันไทม์ (retention time) เป็น 4.09, 1.77, 1.31, 3.10, 9.96 ตามลำดับ

7. <u>การวัดปริมาณแก๊สและการวิเคราะห์องค์ประกอบของแก๊ส</u>

ปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นจากการหมัก วัดโดยวิธีการปล่อยแก๊สเข้าแทนที่น้ำ ปริมาตรของน้ำที่ลดลงจะเท่ากับปริมาตรของแก๊สที่สร้างขึ้น ตามระยะเวลาต่าง ๆ งานวิจัยนี้ใช้

บิกเกอร์ขนาด 5 ลิตร บรรจุน้ำเต็ม คว่ำลงในภาชนะรองรับ ต่อท่อแก๊สจากถังหมักมาที่ด้านล่างของบิกเกอร์ที่บรรจุน้ำ

องค์ประกอบของแก๊ส วิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟฟีก๊าซของ Gow-Mac Instrument Co., series 150 กับเรคอร์ดเตอร์ (recorder) ของ Shimadzu model R-111 สภาวะที่ใช้มีดังนี้

คอลัมน์ A ขนาด 5m x 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย MS 5A 80/100 mesh เพื่อวิเคราะห์แก๊สคาร์บอนมอนนอกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน

คอลัมน์ B ขนาด 3m x 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย porapak Q 80/100 PQL2 เพื่อวิเคราะห์แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์, น้ำ และแก๊สมีเธน อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector) 80 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector) 80 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สอาร์กอน 30 มล.ต่อนาที ปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน หาได้จากการเทียบความสูงของพีค จากกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างความสูงของพีคกับปริมาณของแก๊สคาร์บอน-ไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน

8. <u>การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือ</u>

ใช้วิธีดัดแปลงจาก AOAC (35) ดังนี้ นำตัวอย่างของน้ำหมัก (fermentation broth) มา 10 มล. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนตะกอนใส ตะกอนที่ได้ใส่ใน ขวดก้นกลมขนาด 250 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตร 10 มล. เติมน้ำกลั่น 90 มล. นำไปย่อยสลายในอ่างน้ำเดือด 2.30 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น เติมบรอมไธมอล บลู (bromthymol blue) 2-3 หยด ทำให้เป็นกลาง (Neutralization) โดยการเติม 4 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 มล. นำไปไตเตรตกับ 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จุดยุติสารละลาย

จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอมเขียว วัดปริมาตรสุดท้าย นำไปหาปริมาณน้ำตาล (กลูโคส) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ค่าที่ได้คูณด้วย 0.9 เป็นปริมาณแป้งที่มีอยู่

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยวิธีการของ Miller (36) นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 1 มล. เติมดีเอ็นเอส รีเอเจนต์ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก. หมายเลข 3) 4 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 20-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

10 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงคลอสตริเดียมเพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอลจากอาหารแป้งมันสำปะหลังในหลอดทดลอง

10.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงคลอสตริเดียมที่ได้จากข้อ 3.4 ตามวิธีการในข้อ 4. ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปหาปริมาณอาซีโตน-บิวทานอล โดยโครมาโตกราฟฟีแก๊สที่แสดงในข้อ 6.

10.2 การหาปริมาณแป้งที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียมที่ได้จากข้อ 3.4 ตามวิธีการในข้อ 4. ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 5, 7 และ 10% ตามลำดับ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

11. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 เพื่อผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในถังหมัก

11.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรอุณหภูมิเป็น 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่างการหมัก วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริค ตามวิธีการในข้อ 6.

11.2 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ผันแปรการควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริค ตามวิธีการในข้อ 6.

11.3 การหาปริมาณแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงเชื้อคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 4 ถึง 7% ควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างในสภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก และกรดบิวทิริค ตามวิธีการในข้อ 6. วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือตามวิธีการในข้อ 8.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.4 ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

11.4.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น ๐.2 ถึง ๐.8% ควบคุมอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างในสภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก และกรดบิวทิริค ตามวิธีการในข้อ 6. วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือตามวิธีการในข้อ 8.

11.4.2 ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น ๐.2, ๐.3, ๐.4, ๐.5 และ ๐.6% และเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ๐.2%

11.5 ศึกษาผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) แต่ผันแปรปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น ๐.๐๐ ถึง ๐.๐4% ควบคุมอุณหภูมิความเป็นกรดด่างในสภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริค ตามวิธีการในข้อ 6. วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือตามวิธีการในข้อ 8.

12. ศึกษาพฤติกรรมการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา การผลิตอาซีโตน-บิวทานอล ในสภาวะที่เหมาะสมของคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2

เลี้ยงคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 ตามวิธีการในข้อ 5. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) ที่ปริมาณของสารอาหารเหมาะสมที่สุด อุณหภูมิ ความเป็นกรด

ต่างในสภาวะที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณอาซีโตน บิวทานอล เอธานอล กรดอะเซติก กรดบิวทิริด ตามวิธีการในข้อ 6. วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือตามวิธีการในข้อ 8. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการในข้อ 9. วัดปริมาณแก๊สและหาองค์ประกอบของแก๊สตามวิธีการในข้อ 7.

13. การจำแนกชนิดของคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) และลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiological characteristic) ของคลอสตริเดียม สายพันธุ์ 8p-2 เพื่อจำแนกชนิด โดยยึดหลักตาม Buchanan และ Gibbons (30)

13.1 ลักษณะที่ศึกษาทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโคโลนี รูปร่างและสีของโคโลนี
รูปร่างของเซลล์
การติดสีกรัม
การสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์

13.2 ลักษณะบางประการทางสรีระวิทยา

การเจริญได้ในสภาพออกซิเจน
การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase)
การย่อยสลายเจลาติน
การรีดิวซ์ไนเตรต
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)
การใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน
การใช้น้ำตาลกลูโคส
การใช้น้ำตาลราฟิโนส (raffinose)

การใช้น้ำตาลดูซิทอล (ducitol)

การใช้น้ำตาลไซโลส (xylose)

การใช้น้ำตาลทรีฮาโลส (trehalose)

การใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17480283