บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 เชื้อราประเภทเส้นใย (filamentous fungi) 3 ชนิด คือ

T. reesei	QM 6a	TISTR 3080
T. reesei	QM 9414	TISTR 3081
Aspergillus sp.		TISTR 3335

1.2 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมัก

S. cerevisiae	TISTR 5021

เชื้อจุลินทรีย์ได้รับจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Bangkok MIRCEN)

2. วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในการศึกษา 4 ชนิด คือ

2.1 ฟางข้าว (rice straws) เก็บจากท้องนา

2.2 ซังข้าวโพด (corn cobs) เก็บจากแปลงเกษตรกร

2.3 ชานอ้อย (bagasses) เก็บจากร้านขายน้ำอ้อยคั้น

2.4 ต้นมันสำปะหลัง (cassava stalks) เก็บจากแปลงเกษตรกร

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

3.1 เครื่องวัดน้ำตาลกลูโคส
(glucose analyzer YSI Model 27 USA)

3.2 เครื่องวัดแอลกอฮอล์ liquid gas chromatography
(Model Shimadzu,7AG)

3.3 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.4 เครื่องปั่นแยก (centifuge)

3.5 เครื่องหมัก

(Fermentor Model BIOFLO IIc ขนาด 5,000 ml.)

3.6 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า

(incubator shaker Model G 25)

สารเคมี

1. Carboxymethyl cellulose
2. Microcrystalline cellulose
3. Yeast extract
4. Malt extract
5. Agar
6. D-glucose
7. $(NH_4)_2\ SO_4$
8. KH_2PO_4
9. $CaCl_2$
10. HCl
11. NaOH
12. $MgSo_4$
13. $MnSo_4$
14. $FeSO_4$
15. $CoCl_2$
16. $ZnSo_4$
17. CH_3COOH
18. Sodium acetate
19. Tween 80
20. Corn steep liquor
21. Enzyme celluclast
22. Enzyme novozyme
23. Potato dextrose agar

วิธีดำเนินการศึกษา

ขั้นตอนที่ 1. การทดสอบเชื้อราเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 นำเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนสไลด์ซึ่งมีอาหารแข็งสูตร PDA (slide culture) เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.2 ทดสอบเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร PDA นำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน จากนั้น ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร production medium (Punnapayak et al., 1986) โดยใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มล. บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. การถ่ายเชื้อใช้ cork borer ขนาด 0.5 ซม. ตัดเส้นใยบนอาหารแข็งนำไปในอาหารเหลวที่เตรียมไว้จานวน 5 ชิ้น/อาหารเลี้ยงเชื้อ100 มล. นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าโดยใช้ incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ ทุก 3 วัน จนครบ 15 วัน การวิเคราะห์ activity ของ endoglucanase ใช้วิธี carboxyl methylcellulase (CMCase) activity และวิเคราะห์ cellulase activity ด้วย วิธี filter paper activity (FPA) (ตามภาคผนวก ช) เปรียบเทียบ activity ของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้จากเชื้อราทั้ง 3 ชนิด คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ช่วงเวลาเหมาะสม นำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่ให้ activity สูงสุด โดยมีวิธีการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ยกเว้นใช้ microcrystalline cellulose 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท

ขั้นตอนที่ 2 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อเพิ่มขนาดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้ว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากขั้นตอนที่ 1 มาผลิตเอนไซม์โดยเพิ่มปริมาตรการผลิตการผลิตเป็น 3,000 มล. เลี้ยงในถังหมัก (ภาพที่ 6 ก.) เป็นเวลานาน 12 วัน จากนั้นนำอาหารที่ใช้

เลี้ยงมาปั่นเป็นเวลา 5 นาที ก็จะได้ crude enzyme cellulase (ภาพที่ 6 ข.) ไว้ใช้ในการย่อยสลายวัสดุประเภทเซลลูโลสในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การปรับสภาพ (pretreatment)

นำวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 4 ชนิด (ภาพที่ 7) นำมาทำให้มีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 8) โดยมีวิธีการดังนี้

ฟางข้าว ใช้กรรไกรตัดให้มีขนาดเล็กลงขนาด 0.5-1.0 ซม.

ซังข้าวโพด นำไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องขูดมะพร้าว

ชานอ้อย ตัดให้มีขนาดเล็กลงและนำไปบดด้วยเครื่องปั่น

ต้นมันสำปะหลัง นำไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องขูดมะพร้าว

นำวัตถุดิบดังกล่าวไปหาน้ำหนักแห้ง (ตามภาคผนวก ข.) จากนั้นนำไปทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

นำวัตถุดิบทั้ง 4 ชนิดไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง

นำไปต้มใน water bath ใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนฟางข้าวต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง

ล้างด้วยน้ำประปาจนมีค่า pH เท่ากับ 7 เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป (ภาพที่ 9) นำตัวอย่างบางส่วนไปหาน้ำหนักแห้ง เพื่อใช้เป็นน้ำหนักในการแยกน้ำตาล

ขั้นตอนที่ 4 การแยกน้ำตาลจากเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส (enzymatic hydrolysis)

4.1 การแยกน้ำตาลจากเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เพื่อการค้นำวัตถุดิบที่ผ่านการปรับสภาพจากขั้นตอนที่ 3 มาชั่งใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มล. จำนวน 10 กรัมน้ำหนักแห้ง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นเติมเอนไซม์เพื่อการค้า 2 ชนิด คือ Celluclast และ Novozyme จากนั้นนำไปบ่มในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน โดยมีการเติมวัสดุที่ปรับสภาพแล้วในวันที่ 3 และวันที่ 5 ครั้งละ 5 กรัมน้ำหนักแห้ง (รวมวัสดุที่ใช้ทั้งหมด 20 กรัมน้ำหนักแห้ง)

เมื่อครบ 7 วัน นำมาแยกน้ำตาลออกโดยใช้เครื่องปั่นแยก นำแต่ละฟลาสก์มาวัด pH นำส่วนที่เป็นน้ำใสบางส่วนมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ ตามวิธีของ Miller (1959) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เครื่อง glucose analyzer นำส่วนน้ำใสที่ได้มาแยกเอนไซม์โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมากรอง นำน้ำตาลที่กรองได้มาทำให้เข้มข้นสูงขึ้นโดยการระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำเป็น molasses medium ตามวิธีของ Kunnuanta และคณะ (1981) แบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มล. ฟลาสก์ละ 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น นำตัวอย่างบางส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวซ์และวัด pH ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นก่อนการหมัก

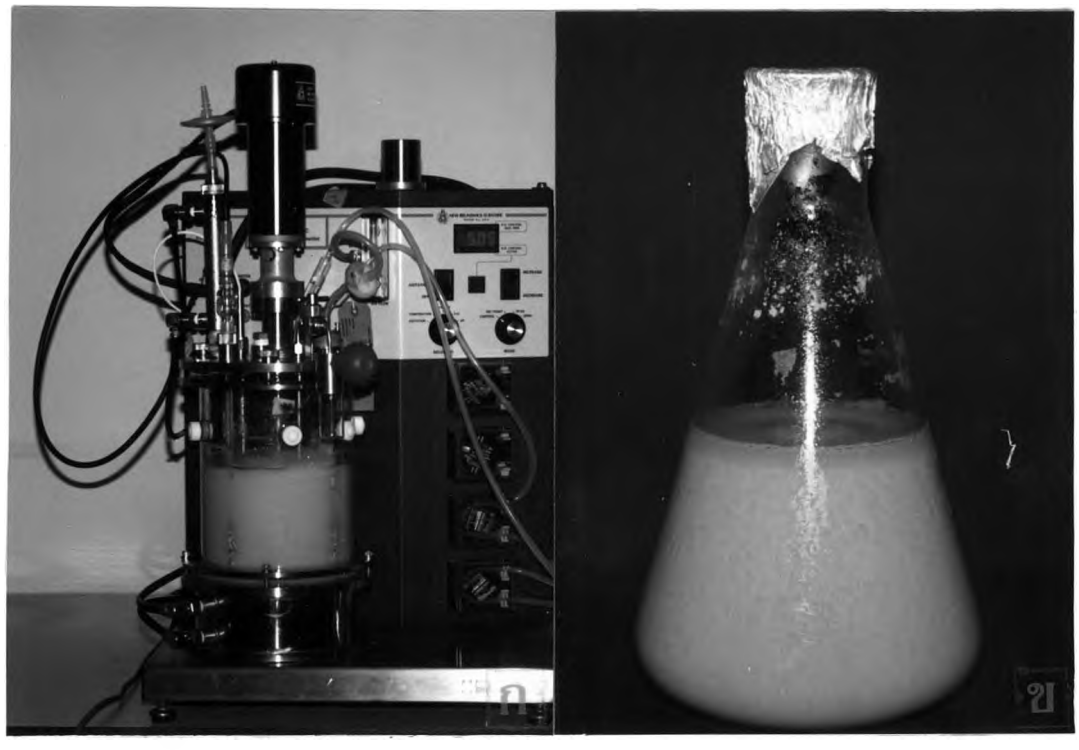
4.2 การแยกน้ำตาลจากเซลลุโลสโดยใช้ crude enzyme cellulase จากเชื้อราที่คัดเลือกได้ วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.1 แต่ใช้วัสดุที่ปรับสภาพแล้ว 10 กรัมน้ำหนักแห้ง เติม crude enzyme cellulase ฟลาสก์ละ 100 มล. (ใช้อัตราส่วนของ substrate/enzyme = 1:10 น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีของ Fan และคณะ (1981)

ขั้นตอนที่ 5 การหมักเอทธานอลและการเก็บผล

5.1 การเตรียมหัวเชื้อ ถ่ายเชื้อยีสต์จากหลอด stock ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร YMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ถ่ายเชื้อจากหลอดลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าโดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกจำนวนเชื้อเริ่มต้น

5.2 การหมักเอทธานอลและการวิเคราะห์ผล นำน้ำตาลที่สกัดได้และผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจากวิธีการข้อ 4 มาเติมหัวเชื้อที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 5.1 (เติมหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลทุกวันเป็นเวลา 4 วัน การวิเคราะห์ผลทำโดยวัด pH ใน ตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และวิเคราะห์เอทธานอลในแต่ละชวดทุกวัน บันทึกผลการทดลอง

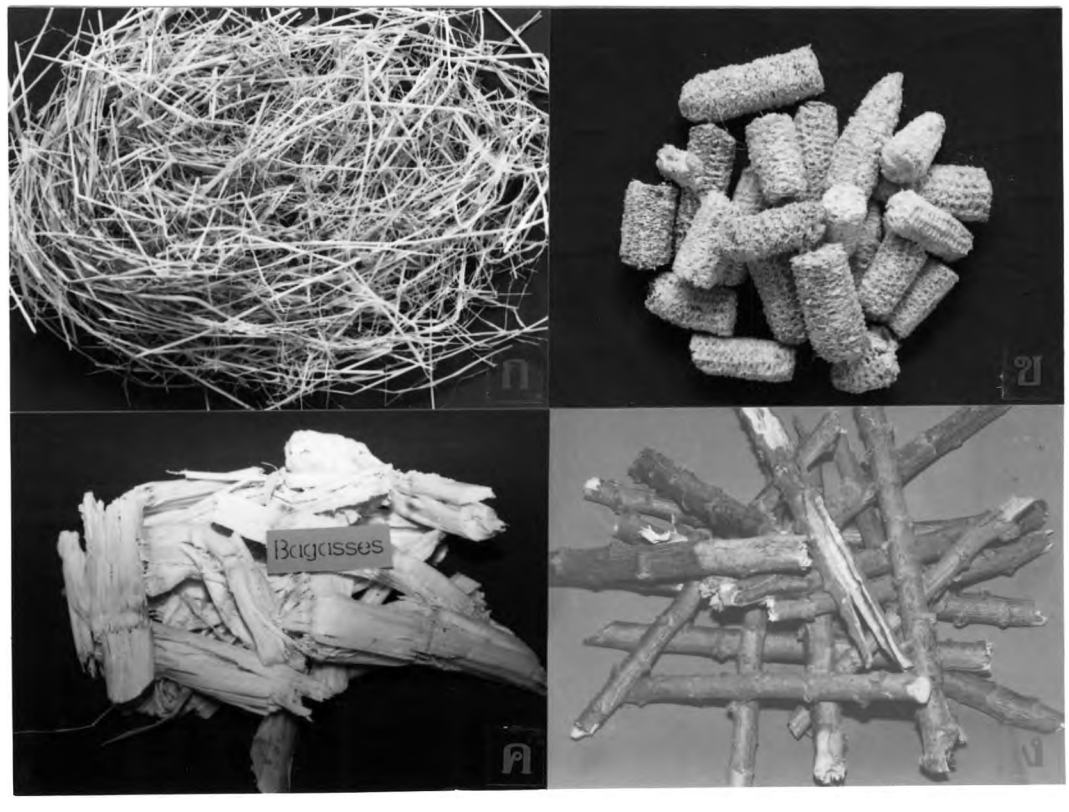
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6

ก. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา T. reesei QM 6a ในถังหมักเพื่อเพิ่มขนาดการผลิต

ข. crude enzyme cellulase ที่ผลิตได้ และใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสที่ปรับสภาพแล้ว



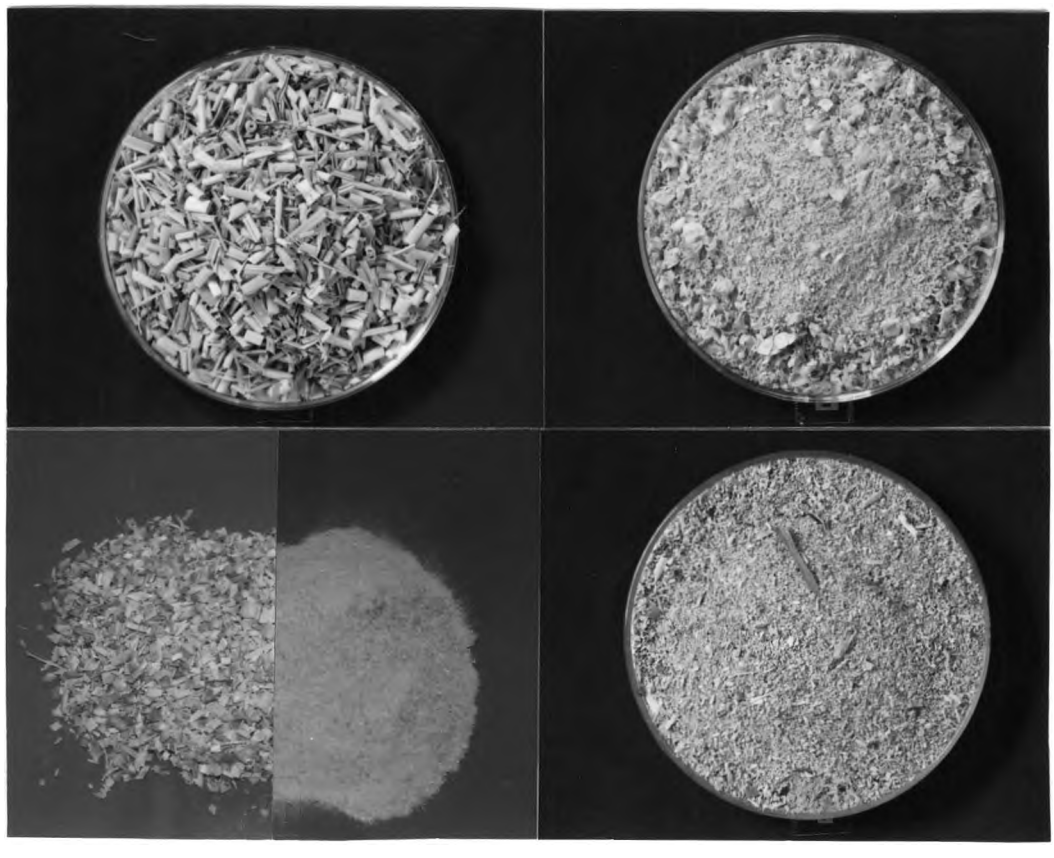
ภาพที่ 7

ก. ฟางข้าวที่เก็บจากท้องนาเพื่อนำมาใช้ศึกษา

ข. ซังข้าวโพดที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ศึกษา

ค. ชานอ้อยที่เก็บจากร้านคั้นน้ำอ้อยเพื่อนำมาใช้ศึกษา

ง. ต้นมันสำปะหลังที่เก็บจากแปลงเกษตรกรเพื่อนามาใช้ศึกษา



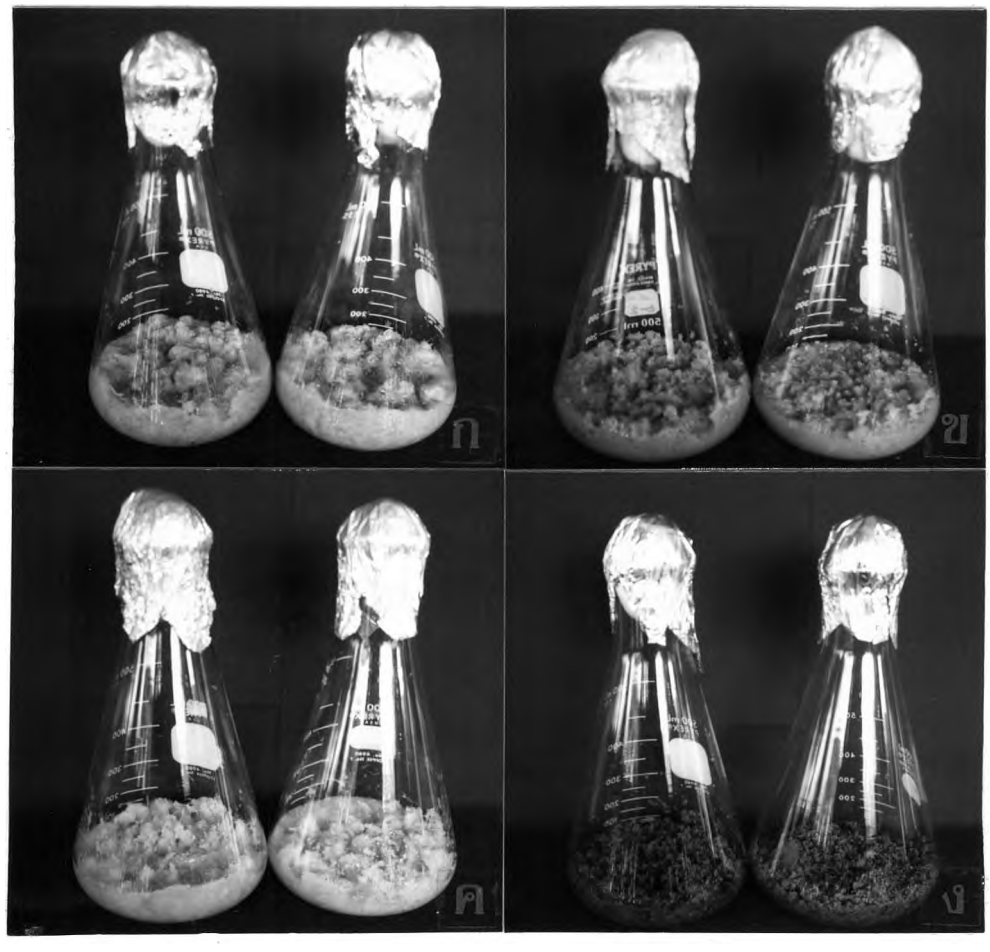
ภาพที่ 8

ก. ฟางข้าวที่ปรับสภาพด้วยวิธีการตัด

ข. ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยการบด

ค. ชานอ้อยที่ปรับสภาพด้วยการตัดและบด

ง. ต้นมันสำปะหลังที่ปรับสภาพด้วยการบด



ภาพที่ 9

ก. ฟางข้าวที่ปรับสภาพแล้วและเตรียมเพื่อการย่อยสลาย
ข. ซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้วและเตรียมเพื่อการย่อยสลาย
ค. ชานอ้อยที่ปรับสภาพแล้วและเตรียมเพื่อการย่อยสลาย
ง. ต้นมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้วและเตรียมเพื่อการย่อยสลาย