ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน (A.O.A.C., 1999)

สารเคมี

1. อะซิโตน หรือแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 โดยน้ำหนัก
2. กรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 75 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
3. กรดซัลฟุริกเข้มข้น 1.00 นอร์มัล
4. Decahydronapthalene
5. Acid detergent solution

   วิธีการเตรียม เติม Cetyl trimethylammonium bromide 20 กรัม ในกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1.00 นอร์มัล

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร มาประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และDecahydronapthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อน และให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนให้เดือดเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที

3. กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (W_1) โดยใช้แรงดึงดูดสุญญากาศเบาๆ ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง ขณะล้างให้เขี่ยก้อนเยื่อใยที่อยู่ในครูซิเบิลให้กระจายออก โดยใช้แท่งแก้ว หลังจากนั้นให้ดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ และล้างต่อด้วยอะซิโตนปริมาณเล็กน้อยปริมาณ 2-3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ

4. นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักที่ชั่งได้คงที่ (W_2)

5. นำครูซิเบิลไปวางในถาดก้นตื้น เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 72 (ก่อนใช้ให้แช่เย็นที่ 15 องศาเซลเซียส) ลงในครูซิเบิลประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วคนด้วยแท่งแก้วคนเพื่อให้เยื่อใยเปียกทั่วถึง เติมกรดเพิ่มลงไปทุก 1 ชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6. นำครูซิเบิลไปกรองเอากรดออก โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

7. อบครูซิเบิลที่ได้จากข้อ 6 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดความชื้น ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (W_3)

8. นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_4)

การคำนวณ

$$ADF = \frac{(W_2 - W1) \times 100}{S}$$

$$L = \frac{(W_3 - W4) \times 100}{S}$$

$$C = ADF - L$$

โดยที่ ADF = Acid detergent fiber (ร้อยละ)

L = ปริมาณลิกนิน (ร้อยละ)

C = ปริมาณเซลลูโลส (ร้อยละ)

W_1 = น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า (กรัม)

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังย่อยด้วย Acid detergent (กรัม)

W_3 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านกรดซัลฟุริก (กรัม)

W_4 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

2. ปริมาณความชื้น

ชั่งเส้นใยปาล์มที่บดละเอียดประมาณ 0.5000 กรัม ใส่ใน Moisture can ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว (W_1) นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W_2) คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น(\%)} = \frac{(W_2 - W1) \times 100}{\text{ปริมาณเส้นใยปาล์ม(กรัม)}}$$

3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ โดยวิธี DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959)

สารเคมี

1. 3,5-Dinitrosalicylic acid
2. Sodiumhydroxide
3. Sodium potassium tartrate

DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) reagent

ชั่งสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบน hot plate เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(32 กรัม ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันแล้วค่อยๆเติม sodium potassium tartrate 600 กรัม ปรับปริมาตร ให้ครบ 2,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในขวดสีชา ในอุณภูมิห้อง

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 1.0 กรัมต่อลิตร โดยการชั่งน้ำตาลกลูโคสที่อบแห้งแล้วปริมาณ 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ ให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมลงในหลอดทดลอง ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid reagent) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดระยะเวลา 10 นาที ย้ายลงในน้ำเย็นทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แช่ไว้ประมาณ 10 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

4. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography (Agilent Technologies 6890N Network System) โดยใช้ Headspace (Agilent Technologies G1888 Network Headspace Sampler) ในการฉีดตัวอย่างเข้าไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column	:	HP-INNOWAX 19091 N-133
Column description	:	ท่อเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.251 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร
Column Tempurature	:	120 องศาเซลเซียส (15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 120 องศาเซลเซียส)
Inject Tempurature	:	220 องศาเซลเซียส
Detector	:	FID (flame-ionized detector)
Carier gas, flow rate	:	Helium อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที

5. วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง, 2523)

วัสดุอุปกรณ์

1. Hemacytometer
2. กล้องจุลทรรศน์
3. Methylene blue

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่างมาเจือจางในสารละลาย 0.2% methyl blue ในหลอดทดสอบ โดยกะอัตราส่วนอย่างคร่าวๆ ผสมให้เข้ากัน

2. เช็ดสไลด์ให้ และ Cover glass ของ Hemacytometer ให้สะอาด วาง Cover glass ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1. มาแตะที่ขอบ Cover glass ปล่อยให้สารละลายของเซลล์แทรกไประหว่าง cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี และทำอีกด้านหนึ่งในทำนองเดียวกัน

3. นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยถือว่าเซลล์ที่ติดสีทึบหมดทั้งเซลล์เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็นเซลล์ที่มีชีวิต การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะนับเซลล์ที่ไม่ติดสีทั้งหมดที่อยู่ในตารางใหญ่ เซลล์ที่อยู่คาบเส้นทั้งด้านขวาและ ด้านล่าง ส่วนเซลล์ที่คาบเส้นอยู่ทางดานซ้าย และ ด้านบนจะไม่นับ จำนวนเซลล์ที่นับได้ต้อง

อยู่ระหว่าง 10-30 เซลล์ ถ้ามาก หรือน้อยกว่านั่นจะต้องทำการเจือจางใหม่ ทำการนับทีละ Filled ตามแนวทะแยงซ้ายขวา จนกระทั้งได้จำนวนเซลล์รวมทั้งหมดประมาณ 300 เซลล์

การคำนวน

ขนาดความลึกของ Hemacytometer = 0.1 mm

ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer = 0.2 x 0.2 mm^2

ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer = 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mm

= 0.02 cm x 0.02 cm x 0.01 cm

= 0.000004 cm^3

= 0.000004 mL

= 4×10^{-6} mL

เซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยนที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่ (Y) x 10^6 x (1/4) x Dilution

= Y x 10^6 x (1/4) x Dilution

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.1 กิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase ด้วยวิธี Filter Paper Assay (Mandels และคณะ, 1976 อ้างโดย Ghose, 1987)

วัสดุอุปกรณ์

1. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman NO. 1) ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร
2. 0.05 M Citrate buffer pH 4.8
3. ตัวอย่างเอนไซม์เซลลูเลส
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องสาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง จากนั้นเติมสารละลาย Citrate buffer 0.05 M ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์ อีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method

Filter paper blank

ใส่กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1 x 6 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง จากนั้นเติมสารละลาย Citrate buffer 0.05 M ที่ความเป็นกรดด่าง 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Citrate buffer 0.05 M อีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method

เอนไซม์ 1 หน่วย (FPU) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น (กระดาษกรอง whatman NO.1) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μmol ในเวลา 1 นาที

6.2 กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ด้วยวิธี Cellobiase assay (Sternberg และคณะ, 1977 อ้างโดย Ghose, 1987)

วัสดุอุปกรณ์

1. เซลลูไบโอส 15 mM (ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์)
2. 0.05 M Citrate buffer pH 4.8
3. ตัวอย่างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

วิธีการทดลอง

เติมสารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร (เจือจางในซิเตรตบัฟเฟอร์) ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง (ควรจะทำ 2 Dilution ในแต่ละตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเซลลูไบโอส 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วย้ายหลอดทดลองลงในน้ำเย็นทันที หากมีตะกอนแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใส่ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method

Cellobiose blank

เติมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเซลลูไบโอส 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการแช่

ในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วย้ายหลอดทดลองลงในน้ำเย็นทันที หากมีตะกอนแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใส่ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method

เอนไซม์ 1 หน่วย (U) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้น (เซลลูไบโอส) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 2 μmol ในเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. เตรียม 1%(w/v) NaOH (commercial grad)

ชั่งผลึกโซเดียมไฮดรอกไซม์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. เตรียม 5%(w/v) NaOH (commercial grad)

ชั่งผลึกโซเดียมไฮดรอกไซม์ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. เตรียม 10%(w/v) NaOH (commercial grad)

ชั่งผลึกโซเดียมไฮดรอกไซม์ 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. เตรียม 15%(w/v) NaOH (commercial grad)

ชั่งผลึกโซเดียมไฮดรอกไซม์ 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5. เตรียม 1%(w/v) $Ca(OH)_2$ (commercial grad)

ชั่งแคลเซียมไฮดรอกไซม์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

6. เตรียม 5%(w/v) $Ca(OH)_2$ (commercial grad)

ชั่งแคลเซียมไฮดรอกไซม์ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

7. เตรียม 10%(w/v) $Ca(OH)_2$ (commercial grad)

ชั่งแคลเซียมไฮดรอกไซม์ 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

8. เตรียม 15%(w/v) $Ca(OH)_2$ (commercial grad)

ชั่งแคลเซียมไฮดรอกไซม์ 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

9. เตรียม 1 N H_2SO_4 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวงกรด H_2SO_4 96% (w/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

10. เตรียม 72%(w/v) H_2SO_4 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ตวงกรด H_2SO_4 96% (w/v) ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

11. เตรียมสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลลาร์ pH 4.5, 4.8, 5.0 และ 5.5

1. เตรียมสารละลาย Citric acid monohydrate ปริมาณ 0.05 โมลลาร์ (ชั่ง Citric acid monohydrate 2.104 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร)

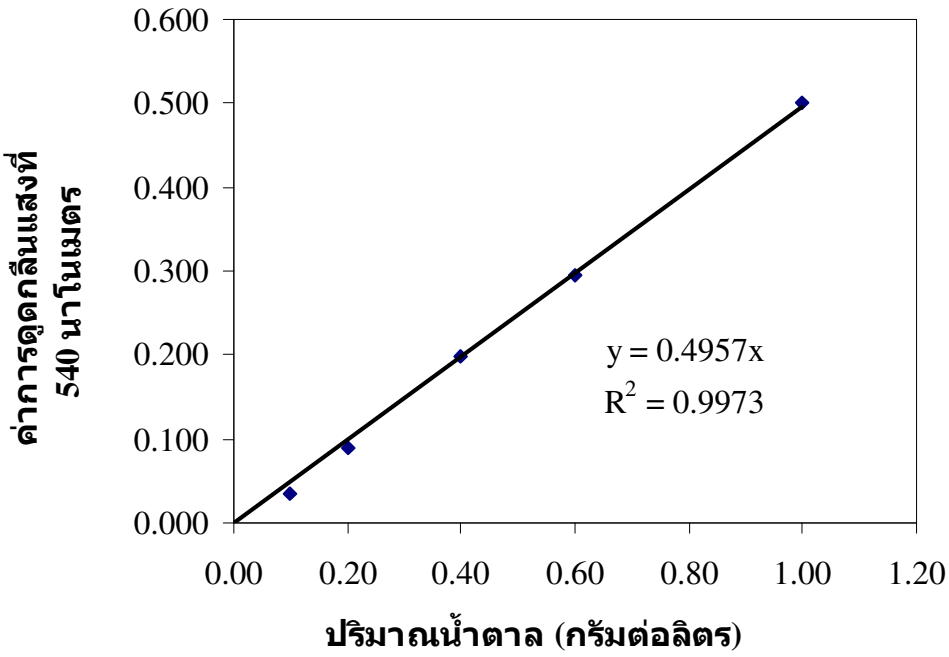
2. เตรียมสารละลาย Tri-sodium citrate ปริมาณ 0.05 โมลลาร์ (ชั่ง Tri-sodium citrate 4.4115 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 300 มิลลิลิตร)

3. นำสารละลาย Citric acid monohydrate ใส่ในบีกเกอร์ จากนั่นค่อยๆเติมสารละลาย Tri-sodium citrate จนได้พีเอชตามที่ต้องการ และเก็บไว้ในขวดสีชา

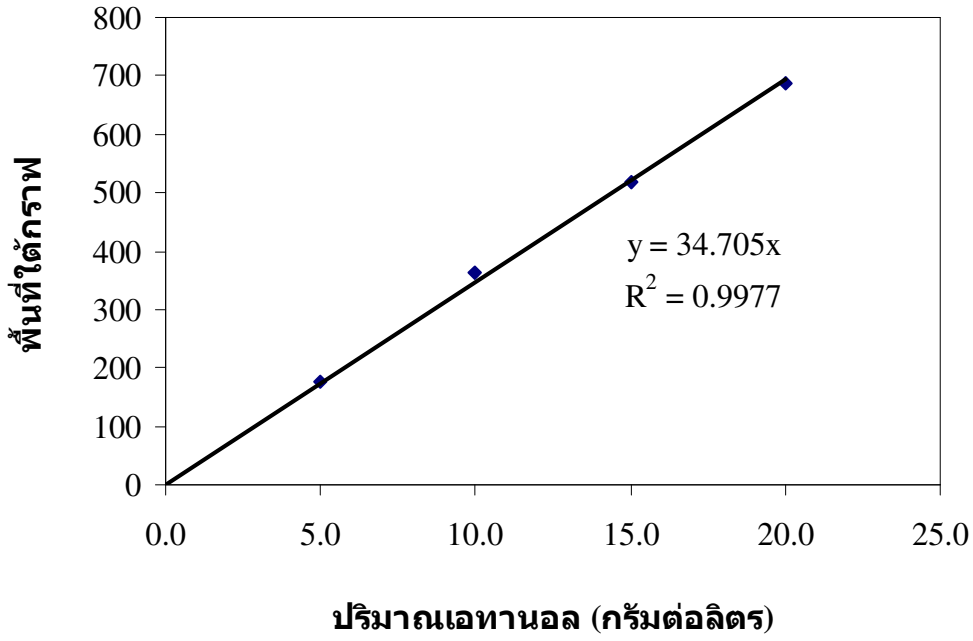
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS Reagent



2. กราฟมาตรฐานเอทานอลจากเครื่อง GC



ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลอง

1. ศึกษาการเตรียมเส้นใยปาล์ม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และลิกนินโดยวิธี A.O.A.C., 1999.

ตารางที่ 10 ปริมาณเซลลูโลสในเส้นใยปาล์มที่ผ่านการเตรียม และไม่เตรียมด้วยสารเคมี

Table 10 Cellulose and lignin in palm pressed fiber after pretreatment and no pretreatment.

วิธีการเตรียม		องค์ประกอบของเส้นใยปาล์ม (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			ปริมาณที่เหลือหลังการเตรียม (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)			ปริมาณลิกนินที่ลดลง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)
สารเคมี	ระยะเวลาสารเดือด (นาที)	ปริมาณเซลลูโลส	ปริมาณลิกนิน	ปริมาณความชื้น	ปริมาณเส้นใยปาล์ม	ปริมาณเซลลูโลส	ปริมาณลิกนิน	
No pretreatment	-	29.82 ± 0.57	17.79 ± 0.47	9.53 ± 0.15	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	23.01 ± 0.67
NaOH 1%, w/v (Commercial grad)	15	41.21 ± 1.02	21.75 ± 0.93	8.70 ± 0.09	66.06 ± 0.90	91.28 ± 2.53	80.76 ± 3.25	19.24 ± 3.25
	30	41.69 ± 0.94	22.20 ± 0.86	8.66 ± 0.33	65.27 ± 0.08	91.23 ± 2.12	81.43 ± 3.23	18.57 ± 3.23
	60	39.60 ± 1.08	21.80 ± 0.98	8.51 ± 0.20	64.60 ± 0.99	85.76 ± 2.05	79.16 ± 3.97	20.84 ± 3.97
	90	39.94 ± 1.12	22.50 ± 1.07	7.56 ± 0.20	63.33 ± 0.85	84.81 ± 2.04	80.12 ± 4.60	19.98 ± 4.60
NaOH 5%, w/v (Commercial grad)	15	47.74 ± 0.34	19.75 ± 0.90	9.22 ± 0.06	53.27 ± 0.89	85.27 ± 1.14	59.16 ± 3.58	40.84 ± 3.58
	30	49.96 ± 0.92	19.80 ± 0.62	9.28 ± 0.07	50.14 ± 0.64	83.97 ± 0.48	55.82 ± 2.31	44.18 ± 2.31
	60	51.75 ± 0.65	18.17 ± 0.20	9.32 ± 0.15	43.19 ± 0.40	74.94 ± 1.63	44.11 ± 0.80	55.89 ± 0.80
	90	49.87 ± 0.70	18.24 ± 0.14	9.40 ± 0.09	42.09 ± 0.75	70.38 ± 1.01	43.17 ± 1.02	56.83 ± 1.02
NaOH 10%, w/v (Commercial grad)	15	54.13 ± 0.87	20.48 ± 0.66	9.02 ± 0.05	48.55 ± 0.79	88.09 ± 0.26	55.86 ± 1.10	44.14 ± 1.10
	30	46.05 ± 0.72	18.73 ± 0.68	8.71 ± 0.07	47.04 ± 0.73	72.64 ± 1.72	49.52 ± 2.16	50.48 ± 2.16
	60	49.39 ± 0.24	20.00 ± 0.88	8.72 ± 0.00	39.22 ± 0.42	62.61 ± 2.50	44.83 ± 0.85	55.17 ± 0.85
	90	44.22 ± 1.34	19.69 ± 0.75	8.97 ± 0.24	38.13 ± 0.94	56.53 ± 1.94	42.19 ± 1.99	57.81 ± 1.99

NaOH 15%, w/v (Commercial grad)	15	47.96 ± 0.51	22.50 ± 0.92	8.73 ± 0.13	45.59 ± 0.49	73.31 ± 0.41	57.64 ± 1.92	42.36 ± 1.92
	30	49.03 ± 0.88	19.66 ± 0.34	9.08 ± 0.18	42.59 ± 0.15	70.01 ± 1.40	47.06 ± 0.94	52.94 ± 0.94
	60	45.99 ± 1.24	18.83 ± 0.35	9.03 ± 0.10	38.97 ± 0.50	60.09 ± 1.50	41.25 ± 1.29	58.75 ± 1.29
	90	45.62 ± 0.93	21.99 ± 0.32	9.40 ± 0.04	36.27 ± 0.99	55.50 ± 2.65	44.84 ± 1.82	55.16 ± 1.82
$Ca(OH)_2$ 1%, w/v (Commercial grad)	15	32.91 ± 0.78	20.64 ± 1.17	7.75 ± 0.06	86.07 ± 0.31	94.97 ± 2.57	99.30 ± 4.83	3.37 ± 1.99
	30	34.03 ± 1.46	19.97 ± 1.16	7.67 ± 0.17	83.31 ± 1.91	94.52 ± 5.05	93.47 ± 4.77	6.53 ± 4.77
	60	37.17 ± 1.22	20.39 ± 0.42	7.49 ± 0.43	82.84 ± 2.02	101.47 ± 3.95	94.96 ± 3.81	5.04 ± 3.81
	90	34.43 ± 1.87	21.16 ± 0.61	6.62 ± 0.23	83.57 ± 1.67	95.91 ± 5.05	98.86 ± 4.08	2.85 ± 3.96
$Ca(OH)_2$ 5%, w/v (Commercial grad)	15	31.84 ± 1.44	19.98 ± 0.43	8.51 ± 0.11	84.69 ± 1.06	90.40 ± 3.18	95.11 ± 2.49	4.89 ± 2.49
	30	32.96 ± 1.11	21.12 ± 0.68	8.44 ± 0.02	81.21 ± 0.87	89.74 ± 2.44	96.40 ± 2.27	4.91 ± 0.24
	60	33.55 ± 1.15	19.64 ± 0.68	8.73 ± 0.13	80.65 ± 1.82	90.69 ± 2.22	89.07 ± 5.06	8.18 ± 2.42
	90	31.97 ± 1.30	18.89 ± 0.80	7.76 ± 0.09	81.23 ± 0.59	87.07 ± 3.52	86.28 ± 4.28	16.19 ± 0.22
$Ca(OH)_2$ 10% , w/v (Commercial grad)	15	30.76 ± 1.61	18.70 ± 1.20	7.92 ± 0.11	84.13 ± 0.76	86.75 ± 4.40	88.37 ± 4.89	11.63 ± 4.89
	30	30.29 ± 1.85	17.84 ± 1.08	8.03 ± 0.15	81.76 ± 1.01	83.06 ± 6.11	81.99 ± 5.16	18.01 ± 5.16
	60	29.18 ± 1.87	18.10 ± 0.81	7.27 ± 0.09	81.88 ± 1.21	80.15 ± 6.20	83.32 ± 4.34	16.68 ± 4.34
	90	30.97 ± 1.10	17.13 ± 0.19	6.80 ± 0.05	80.81 ± 1.11	83.88 ± 1.84	77.78 ± 1.60	22.22 ± 1.60
$Ca(OH)_2$ 15%, w/v (Commercial grad)	15	35.74 ± 1.76	19.96 ± 0.38	8.50 ± 0.10	82.50 ± 0.80	98.84 ± 4.17	92.57 ± 2.55	7.43 ± 2.55
	30	31.41 ± 1.13	19.40 ± 0.32	8.40 ± 0.09	82.16 ± 0.77	86.54 ± 3.17	89.57 ± 2.12	10.43 ± 2.12
	60	33.91 ± 1.24	20.52 ± 0.27	8.68 ± 0.01	80.47 ± 1.29	91.53 ± 4.54	92.81 ± 1.82	7.19 ± 1.82
	90	34.54 ± 0.67	19.63 ± 0.95	8.02 ± 0.07	79.71 ± 1.27	92.32 ± 2.74	87.99 ± 5.34	12.01 ± 5.30

2. ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

2.1 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางที่ 11 ปริมาณกิจกรรมของเซลลูเลสในเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

Table 11 Activity of commercials cellulase.

ชนิดเอนไซม์	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (FPU/mg enzyme)
เซลลูเลสจากเชื้อ *A. niger*	1.42	4.08	0.097
เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei*	2.35	3.00	0.218
เซลลูเลสจากเชื้อ *T. viride*	2.11	3.27	0.179

ตารางที่ 12 ปริมาณกิจกรรมของเบต้า-กลูโคซิเดสในเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า

Table 12 Activity of commercials β-glucosidase.

ชนิดเอนไซม์	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (IU/mg enzyme)
เซลลูเลสจากเชื้อ *A. niger*	14.95	43.50	0.064
เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei*	0.09	7.73	0.002
เซลลูเลสจากเชื้อ *T. viride*	1.28	7.30	0.033

2.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

ตารางที่ 13 ปริมาณกิจกรรมของของเบ้ตา-กลูโคซิเดสในเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสทางการค้า

Table 13 Activity of commercials β-glucosidase.

ชนิดเอนไซม์	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ (IU/mg enzyme)
เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *A. niger*	0.75	10.90	0.025
เบต้า-กลูโคซิเดสจาก almonds	1.54	2.30	0.248

3. ผลการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์

3.1 ผลการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ตารางที่ 14 ปริมาณน้ำตาล และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง ที่ได้จากการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มที่เตรียมแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณ 10 FPU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Table 14 Reducing sugar and %Saccharification from pretreated palm pressed fiber hydrolysis by cellulase 10 FPU/g substrate in citrate buffer pH 4.8, 35^{0}C on orbital shaker 160 rpm.

เวลา (ชั่วโมง)	เซลลูเลสจากเชื้อ *A. niger*		เซลลูเลสจากเชื้อ *T. reesei*		เซลลูเลสจากเชื้อ *T. viride*	
	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง
0	0.76 ± 0.00	1.65 ± 0.00	0.77 ± 0.00	1.68 ± 0.00	0.77 ± 0.00	1.68 ± 0.00
24	4.90 ± 0.20	10.68 ± 0.39	5.93 ± 0.17	12.70 ± 0.12	5.18 ± 0.97	11.27 ± 2.09
48	5.23 ± 0.28	11.24 ± 0.57	9.72 ± 0.97	20.61 ± 1.33	8.14 ± 0.57	17.58 ± 0.92
72	6.01 ± 0.37	13.11 ± 0.77	10.42 ± 0.47	22.44 ± 0.93	8.55 ± 0.41	18.36 ± 0.65
96	6.65 ± 0.62	14.10 ± 1.05	11.21 ± 0.95	24.22 ± 2.07	8.96 ± 0.25	19.25 ± 0.76

3.2 ผลการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลสผสมกับเบต้า-กลูโคซิเดส

ตารางที่ 15 ปริมาณน้ำตาล และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง ที่ได้จากการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มที่เตรียมแล้ว ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณ 10 FPU/g substrate ผสมกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส 10 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Table 15 Reducing sugar and %Saccharification from pretreated palm pressed fiber hydrolysis by cellulase 10 FPU/g substrate mix β-glucosidase 10 IU/g substrate in citrate buffer pH 4.8, 35^{0}C on orbital shaker 160 rpm.

เวลา (ชั่วโมง)	เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *A. niger*		เบต้า-กลูโคซิเดสจาก Almonds	
	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง
0	0.77 ± 0.00	1.68 ± 0.00	0.77 ± 0.00	1.68 ± 0.00
24	7.86 ± 0.04	16.30 ± 0.09	6.05 ± 0.02	12.86 ± 0.05
48	12.93 ± 0.08	28.04 ± 0.02	12.76 ± 0.01	27.41 ± 0.12
72	16.48 ± 0.06	36.00 ± 0.33	14.08 ± 0.10	29.88 ± 0.80
96	18.22 ± 0.08	39.54 ± 0.38	15.67 ± 0.11	33.62 ± 0.15

4. ผลการผลิตเอทานอลแบบ SSF

4.1 ปริมาณเส้นใยปาล์มที่เหมาะสม

ตารางที่ 16 ปริมาณเอทานอล และ Y_{EtOH} ที่ได้จากการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 90, 100 และ 110 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 8 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 8 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 16 Ethanol concentrations and yield after ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 90, 100 and 110 g/L. Cellulase from *T. reesei 8* FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 8 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 35^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr.

ปริมาณเส้นใยปาล์ม (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Yield ($g_{EtOH}/g_{Cellulose}$)
90	8.22 ± 0.02	0.17 ± 0.01
100	10.44 ± 0.01	0.19 ± 0.01
110	10.45 ± 0.01	0.18 ± 0.01

4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ตารางที่ 17 ปริมาณเอทานอล และ Y_{EtOH} ที่ได้จากการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 8 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 8 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 17 Ethanol concentrations and yield after ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei 8* FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 8 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 30, 35 and 40^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr.

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Yield ($g_{EtOH}/g_{Cellulose}$)
30	8.61 ± 0.26	0.16 ± 0.03
35	10.44 ± 0.01	0.19 ± 0.01
40	9.90 ± 0.08	0.18 ± 0.02

4.3 พีเอชที่เหมาะสม

ตารางที่ 18 ปริมาณเอทานอล และ Y_{EtOH} ที่ได้จากการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 8 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 8 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 18 Ethanol concentrations and yield after ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei 8* FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 8 IU/g substrate in citrate buffer pH 4.5, 5.0 and 5.5, 35^{0}C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr.

พีเอช	**ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)**	**Yield ($g_{EtOH}/g_{Cellulose}$)**
4.5	10.14 ± 0.25	0.187 ± 0.023
5.0	10.44 ± 0.01	0.193 ± 0.008
5.5	7.80 ± 0.20	0.144 ± 0.019

4.4 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ 19 ปริมาณเอทานอล และ Y_{EtOH} ที่ได้จากการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 4-10 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 4-10 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 19 Ethanol concentrations and yield after ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 4-10 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 4-10 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 35^{0}C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr.

ปริมาณเอนไซม์ FPU/g substrate : IU/g substrate	**ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)**	**Yield ($g_{EtOH}/g_{Cellulose}$)**
4 : 4	6.67 ± 0.16	0.123 ± 0.015
6 : 6	10.42 ± 0.01	0.192 ± 0.007
8 : 8	10.44 ± 0.01	0.193 ± 0.008
10 : 10	10.54 ± 0.02	0.195 ± 0.009

4.5 สัดส่วนปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ตารางที่ 20 ปริมาณเอทานอล และ Y_{EtOH} ที่ได้จากการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 6 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 2-6 FPU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 20 Ethanol concentrations and yield after ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 2-6 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 35^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr.

ปริมาณเอนไซม์ **FPU/g substrate : IU/g substrate**	**ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)**	**Yield** **($g_{EtOH}/g_{Cellulose}$)**
6 : 6	10.42 ± 0.01	0.192 ± 0.006
6 : 3	10.38 ± 0.07	0.192 ± 0.017
6 : 2	7.42 ± 0.01	0.137 ± 0.005

4.6 การเปลี่ยนแปลงของการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 21 ปริมาณเอทานอล, พีอช, น้ำตาลรีดิวส์ และเชื้อยีสต์ ในการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส จาก *T. reesei* 6 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 3 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที หลังจากการไฮโดรไลซีสที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

Table 21 Ethanol concentrations, pH, reducing sugar and yeasts between ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 35^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr. After hydrolysis at 35^0C for 6 hr.

เวลา (ชั่วโมง)	**ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)**	**น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)**	**พีเอช**	**เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)**
-6	0.00 ± 0.00	4.78 ± 0.08	5.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0	2.54 ± 0.21	13.82 ± 0.38	5.02 ± 0.01	9.00×10^7 ± 35.36
12	8.87 ± 0.11	9.53 ± 0.07	4.93 ± 0.04	166.80×10^7 ± 254.56
24	10.43 ± 0.01	10.28 ± 0.28	4.83 ± 0.04	184.00×10^7 ± 141.42
48	7.34 ± 0.21	10.99 ± 0.76	4.81 ± 0.02	202.00×10^7 ± 1202.08
72	6.49 ± 0.59	12.17 ± 1.05	4.80 ± 0.01	194.00×10^7 ± 212.13
96	4.90 ± 0.75	13.13 ± 1.46	4.79 ± 0.01	160.00×10^7 ± 989.95

4.7 การเปลี่ยนแปลงของการผลิตเอทานอลแบบ SHF

ตารางที่ 22 ปริมาณเอทานอล, พีอช, น้ำตาลรีดิวส์ และเชื้อยีสต์ ในการผลิตเอทานอลแบบ SHF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ไฮโดรไลซีสโดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสจาก *T. reesei* 6 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 3 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หมักเอทานอล ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Table 22 Ethanol concentrations, pH, reducing sugar and yeasts between ethanol production by SHF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Hydrolysis with cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 50^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr and fermentation at 30^0C for 96 hr.

เวลา (ชั่วโมง)	**ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)**	**น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)**	**พีเอช**	**เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)**
0	2.02 ± 0.06	29.77 ± 1.59	5.02 ± 0.01	$3.80 \times 10^7 \pm 7.07$
24	7.10 ± 0.51	17.84 ± 0.68	4.94 ± 0.01	$2.10 \times 10^9 \pm 1202.08$
48	6.66 ± 0.49	15.86 ± 0.91	4.92 ± 0.01	$1.60 \times 10^9 \pm 1131.37$
72	7.22 ± 0.11	12.93 ± 2.40	4.90 ± 0.01	$8.80 \times 10^8 \pm 1414.21$
96	6.41 ± 0.60	9.19 ± 1.04	4.87 ± 0.02	$3.60 \times 10^8 \pm 106.07$

4.8 การเปลี่ยนแปลงของการผลิตเอทานอล โดยการทำไฮโดรไลซีส 24 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส แบบกะ ก่อนเข้าระบบ SSF ที่ 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 23 ปริมาณเอทานอล, พีอช, น้ำตาลรีดิวส์ และเชื้อยีสต์ ในการผลิตเอทานอลแบบ SSF โดยใช้ปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส จาก *T. reesei* 6 FPU/g substrate ผสมกับ เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *A. niger* 3 IU/g substrate ในสารละลายซิเตรตบับเฟอร์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที หลังจากการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Table 23 Ethanol concentrations, pH, reducing sugar and yeasts between ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate in citrate buffer pH 5.0, 35^0C on oribital shaker 160 rpm for 24 hr. After hydrolysis at 50^0C for 24 hr.

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
-24	0.00 ± 0.00	6.51 ± 0.09	5.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0	2.08 ± 0.15	34.46 ± 1.25	5.01 ± 0.01	5.80×10^7 ± 7.07
12	11.53 ± 0.57	13.42 ± 0.54	4.92 ± 0.03	58.80×10^7 ± 84.85
24	10.10 ± 0.23	13.69 ± 0.40	4.82 ± 0.01	122.00×10^7 ± 494.97
48	9.15 ± 0.47	14.73 ± 0.03	4.81 ± 0.01	88.00×10^7 ± 282.84
72	6.52 ± 0.35	13.93 ± 0.05	4.79 ± 0.01	80.00×10^7 ± 282.84
96	5.45 ± 0.36	12.96 ± 0.26	4.78 ± 0.01	70.00×10^7 ± 353.55

4.9 การเปลี่ยนแปลงของการผลิตเอทานอล โดยการทำไฮโดรไลซีส 24 ชั่วโมง ที่ 50 องศาเซลเซียส แบบกึ่งกะ ก่อนเข้าระบบ SSF ที่ 35 องศาเซลเซียส

4.9.1 เติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 24 การผลิตเอทานอลแบบ SSF ด้วยปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 6 FPU/g substrate และ เบต้า-กลูโคซิเดส 3 IU/g substrate โดยมีการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 6 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าระบบ SSF ที่ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Table 24 Ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate hydrolysis at 50^0C for 24 hr and fed-batch at 6 hr of hydrolysis at 50^0C prior to SSF at 35^0C in citrate buffer pH 5.0 on oribital shaker 160 rpm.

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
-24	0.00 ± 0.00	6.04 ± 0.17	5.01± 0.01	0.00 ± 0.00
-18	0.00 ± 0.00	27.13 ± 0.63	5.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
-12	0.00 ± 0.00	32.81 ± 0.74	5.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
0	2.82 ± 0.07	37.59 ± 1.21	5.04 ± 0.01	5.20×10^7 ± 14.14
6	7.26 ± 1.10	23.02 ± 1.71	4.96 ± 0.05	6.40×10^8 ± 141.42
12	10.46 ± 1.65	16.06 ± 0.48	4.93 ± 0.01	1.28×10^9 ± 424.26
18	10.51 ± 1.78	16.52 ± 1.20	4.96 ± 0.01	1.22×10^9 ± 70.71
24	10.20 ± 1.60	16.40 ± 0.69	4.89 ± 0.02	1.44×10^9 ± 141.42
30	10.00 ± 1.73	16.08 ± 1.30	4.95 ± 0.02	1.20×10^9 ± 282.82
48	8.71 ± 1.53	17.91 ± 0.93	4.93 ± 0.03	6.40×10^8 ± 1979.90
72	7.36 ± 1.80	17.45 ± 1.31	5.11 ± 0.01	9.00×10^8 ± 212.13
96	5.04 ± 0.79	18.25 ± 0.80	5.09 ± 0.04	8.00×10^8 ± 989.95

4.9.2 เติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 25 การผลิตเอทานอลแบบ SSF ด้วยปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 6 FPU/g substrate และ เบต้า-กลูโคซิเดส 3 IU/g substrate โดยมีการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 12 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าระบบ SSF ที่ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Table 25 Ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate hydrolysis at 50^0C for 24 hr and fed-batch at 12 hr of hydrolysis at 50^0C prior to SSF at 35^0C in citrate buffer pH 5.0 on oribital shaker 160 rpm.

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
-24	0.00 ± 0.00	6.87 ± 0.07	5.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00
-18	0.00 ± 0.00	27.83 ± 0.42	5.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00
-12	0.00 ± 0.00	31.19 ± 0.49	5.02 ± 0.02	0.00 ± 0.00
0	2.63 ± 0.27	41.64 ± 0.89	5.08 ± 0.02	$4.80 \times 10^7 \pm 14.14$
6	8.97 ± 0.96	22.92 ± 1.01	4.95 ± 0.02	$6.60 \times 10^8 \pm 121.13$
12	12.13 ± 0.48	16.27 ± 0.82	4.94 ± 0.02	$1.72 \times 10^9 \pm 424.26$
18	11.79 ± 0.76	16.44 ± 1.01	4.95 ± 0.04	$1.40 \times 10^9 \pm 848.53$
24	11.25 ± 0.64	17.35 ± 1.77	4.96 ± 0.04	$1.88 \times 10^9 \pm 424.26$
30	10.26 ± 0.30	16.49 ± 1.81	4.98 ± 0.01	$1.26 \times 10^9 \pm 636.40$
48	7.89 ± 0.45	16.18 ± 0.85	4.98 ± 0.04	$9.60 \times 10^8 \pm 848.53$
72	5.95 ± 1.31	17.65 ± 1.08	5.01 ± 0.02	$8.40 \times 10^8 \pm 424.26$
96	4.45 ± 1.63	18.32 ± 0.32	5.17 ± 0.10	$7.20 \times 10^8 \pm 989.95$

4.9.3 เติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 26 การผลิตเอทานอลแบบ SSF ด้วยปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 6 FPU/g substrate และ เบต้า-กลูโคซิเดส 3 IU/g substrate โดยมีการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเติมเส้นใยปาล์มที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงของการไฮโดรไลซีสที่ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าระบบ SSF ที่ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที

Table 26 Ethanol production by SSF using initial palm pressed fiber 100 g/L. Cellulase from *T. reesei* 6 FPU/g substrate mix β-glusidase from *A. niger* 3 IU/g substrate hydrolysis at 50^0C for 24 hr and fed-batch at 6 and 12 hr of hydrolysis at 50^0C prior to SSF at 35^0C in citrate buffer pH 5.0 on oribital shaker 160 rpm.

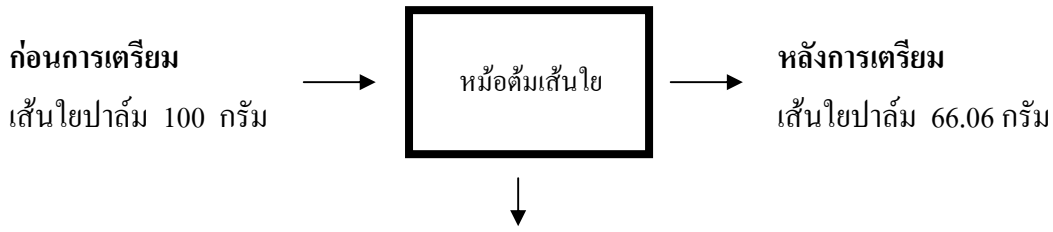
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)	พีเอช	เชื้อยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
-24	0.00 ± 0.00	6.99 ± 0.08	5.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
-18	0.00 ± 0.00	20.36 ± 0.60	5.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00
-12	0.00 ± 0.00	28.70 ± 0.11	5.04 ± .01	0.00 ± 0.00
0	2.88 ± 0.33	36.18 ± 0.74	5.09 ± 0.02	5.00×10^7 ± 35.36
6	8.22 ± 0.84	20.25 ± 0.58	4.91 ± 0.03	2.44×10^8 ± 835.09
12	10.17 ± 1.15	15.98 ± 0.20	4.87 ± 0.03	1.24×10^9 ± 282.80
18	9.94 ± 0.97	16.47 ± 0.08	4.90 ± 0.04	1.18×10^9 ± 212.13
24	9.46 ± 0.35	16.52 ± 0.68	4.90 ± 0.01	1.34×10^9 ± 494.97
30	9.00 ± 0.53	16.49 ± 0.43	4.91 ± 0.04	1.10×10^9 ± 353.55
48	7.00 ± 0.51	17.66 ± 0.05	4.94 ± 0.01	7.80×10^8 ± 212.13
72	5.24 ± 1.03	18.38 ± 0.33	4.95 ± 0.02	6.80×10^8 ± 141.42
96	4.30 ± 0.91	19.55 ± 0.91	4.92 ± 0.02	6.00×10^8 ± 282.84

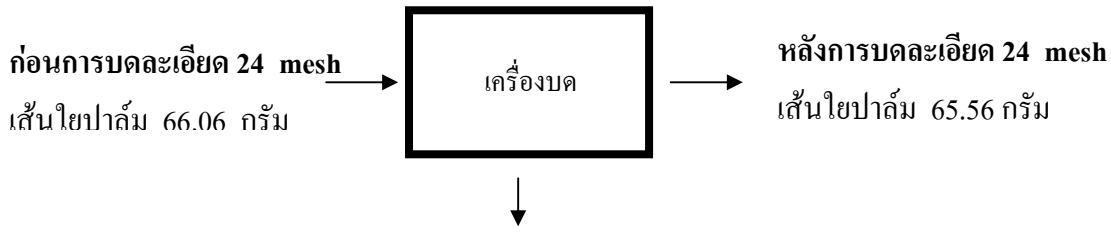
ภาคผนวก จ

การคำนวณ

1. ปริมาณเส้นใยปาล์ม ที่เหลือหลังจากการเตรียม

ตัวอย่างเช่น การเตรียมด้วย 1%(w/v) NaOH/Boiling 15 min





2. ปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน ที่เหลือจากการเตรียม

$$\text{ปริมาณเซลลูโลสที่เหลือ} = \frac{\%\text{เซลลูโลสในเส้นใยปาล์ม} \times \text{ปริมาณเส้นใยปาล์มที่เหลือ}}{100}$$

ตัวอย่างเช่น การเตรียมด้วย 1%(w/v) NaOH/Boiling 15 min

$$= \frac{41.21 \times 66.06}{100}$$

$$= 27.22 \text{ กรัม}$$

ปริมาณเซลลูโลสที่เหลือ(%) = ปริมาณเซลลูโลสที่เหลือ x 100

ปริมาณเซลลูโลสเริ่มต้น(29.82 กรัม)

ตัวอย่างเช่น การเตรียมด้วย 1%(w/v) NaOH/Boiling 15 min

= 27.22 x 100

29.82

= 91.28 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณลิกนินที่เหลือ = %ลิกนินในเส้นใยปาล์ม ปริมาณเส้นใยปาล์มที่เหลือ

100

ตัวอย่างเช่น การเตรียมด้วย 1%(w/v) NaOH/Boiling 15 min

= 21.75 x 66.06

100

= 14.37 กรัม

ปริมาณลิกนินที่เหลือ(%) = ปริมาณลิกนินที่เหลือ x 100

ปริมาณลิกนินเริ่มต้น(17.79 กรัม)

ตัวอย่างเช่น การเตรียมด้วย 1%(w/v) NaOH/Boiling 15 min

= 14.37 x 100

17.79

= 80.78 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณลิกนินที่ลดลง(%)= (ปริมาณลิกนินก่อนการเตรียม - ปริมาณลิกนินหลังจากการเตรียม) x 100

ปริมาณลิกนินก่อนการเตรียม

3. การคำนวณหาหน่วยของเอนไซม์ (Unit of enzyme)

3.1 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ตัวอย่างเช่น Cellulase from *A. niger*

- ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อย 1.4237 กรัมต่อลิตร
- ใช้เวลาในการย่อย 60 นาที
- ความเข้มข้นของเอนไซม์ 4.0763 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาล 1.4237 กรัม

สารละลาย 1.5 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาล $\frac{1.4237 \times 1.5}{1,000} = 2.1356 \times 10^{-3}$ กรัม

น้ำตาลกลูโคส 180 กรัม คิดเป็น 1 โมลล์

น้ำตาลกลูโคส 2.1356×10^{-3} กรัม คิดเป็น $\frac{1 \times 2.1356 \times 10^{-3}}{180} = 11.86$ ไมโครโมลล์

ระยะเวลาการย่อย 60 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล 11.86 ไมโครโมลล์

ระยะเวลาการย่อย 1 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล $\frac{11.86}{60} = 0.1977$ ไมโครโมลล์

ปริมาณน้ำตาล 1 ไมโครโมลล์ต่อนาที คิดเป็น 1 FPU

ปริมาณน้ำตาล 0.1977 ไมโครโมลล์ คิดเป็น $\frac{1 \times 0.1977}{1} = 0.1977$ FPU

ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มีกิจกรรม 0.1977 FPU

ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีกิจกรรม $0.1977 \times 1.0/0.5 = 0.3954$ FPU

ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 4.0763 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นจะได้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ $\frac{0.3954}{4.0763} = 0.097$ FPU/mg enzyme

3.2 การคำนวณกิจกรรมของเบต้า-กลูโคซิเดส

ตัวอย่างเช่น β-glucosidase from *A. niger*

- ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อย 0.7457 กรัมต่อลิตร
- ใช้เวลาในการย่อย 30 นาที
- ความเข้มข้นของเอนไซม์ 4.0763 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาล 0.7457 กรัม

สารละลาย 2.0 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาล $\frac{0.7457 \times 2.0}{1,000} = 1.4914 \times 10^{-3}$ กรัม

น้ำตาลกลูโคส 180 กรัม คิดเป็น 1 โมลล์

น้ำตาลกลูโคส 1.4914×10^{-3} กรัม คิดเป็น $\frac{1 \times 1.4914 \times 10^{-3}}{180} = 8.3$ ไมโครโมลล์

ระยะเวลาการย่อย 30 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล 8.3 ไมโครโมลล์

ระยะเวลาการย่อย 1 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล $\frac{8.3}{30} = 0.2767$ ไมโครโมลล์

ปริมาณน้ำตาล 2 ไมโครโมลล์ คิดเป็น 1 U

ปริมาณน้ำตาล 0.2767 ไมโครโมลล์ คิดเป็น $\frac{1 \times 0.2767}{} = 0.1388$ U

ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร มีกิจกรรม 0.1388 U

ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 10.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นจะได้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ $\frac{0.1388}{10.9} = 0.0127$ U/mg enzyme

4. เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเส้นใยปาล์มเป็นน้ำตาลรีดิวส์ (%Saccharification)

$$\%\text{Saccharification} = \frac{\text{น้ำหนักกรัมของน้ำตาลรีดิวส์} \times 100}{\text{น้ำหนักของเส้นใยปาล์ม}}$$

5. ปริมาณการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอล (Yield)

$$Y = \frac{\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)}}$$