บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 เส้นใยปาล์ม (Palm Pressed Fiber (PPF))

เส้นใยปาล์มได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท น้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด จ.สงขลา นำไปผึ่งแดดให้แห้งสนิทประมาณ 2 วัน แล้วเก็บใส่ลงถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.2 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5596 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) เก็บไว้บนอาหาร YM agar ซึ่งประกอบด้วย 5 g/L Peptone, 3 g/L Yeast extract, 3 g/L Malt extract, 10 g/L Glucose, และ 15 g/L agar เลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture) เดือนละครั้ง

1.3 เอนไซม์

- เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei* จากบริษัท Sigma
- เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma viride* จากบริษัท Sigma
- เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger* จากบริษัท Sigma
- เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *Aspergiilus niger* จากบริษัท Fluka
- เบต้า-กลูโคซิเดสจาก Almonds จากบริษัท Fluka

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ *S. cerevisiae* (YM agar) ซึ่งประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

- สูตรอาหารสำหรับเตรียมเชื้อ *S.cerevisiae* เริ่มต้น ซึ่งประกอบไปด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	36.0	กรัมต่อลิตร

- สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล (Kadar และคณะ, 2004) ซึ่งประกอบด้วย

Yeast extract	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.03	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2HPO_4$	0.5	กรัมต่อลิตร
Tween-20	2.5	กรัมต่อลิตร
PPF pretreated	100.0	กรัมต่อลิตร

2. อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ(Autoclave)
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. ไปเปต
5. หลอดทดลอง
6. เข็มเขี่ยเชื้อ
7. เครื่องชั่ง
8. เครื่องวัด pH
9. เครื่อง Centrifuge
10. เครื่อง HPLC
11. เครื่อง GC
12. เครื่อง Spectrophotometer
13. เครื่องเขย่า
14. Water bath
15. Hemacytometer
16. กล้องจุลทรรศน์

17. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman NO.1)
18. บีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร
19. ชุดกรองแบบสุญญากาศ
20. ตู้อบไฟฟ้า
21. เตาเผา
22. โถดูดความชื้น
23. Fritted glass crucible
24. Hot plate
25. หม้อแสตนเลส
26. ตะกร้า
27. เครื่องบดเส้นใย(Hammer mill)

3. สารเคมี

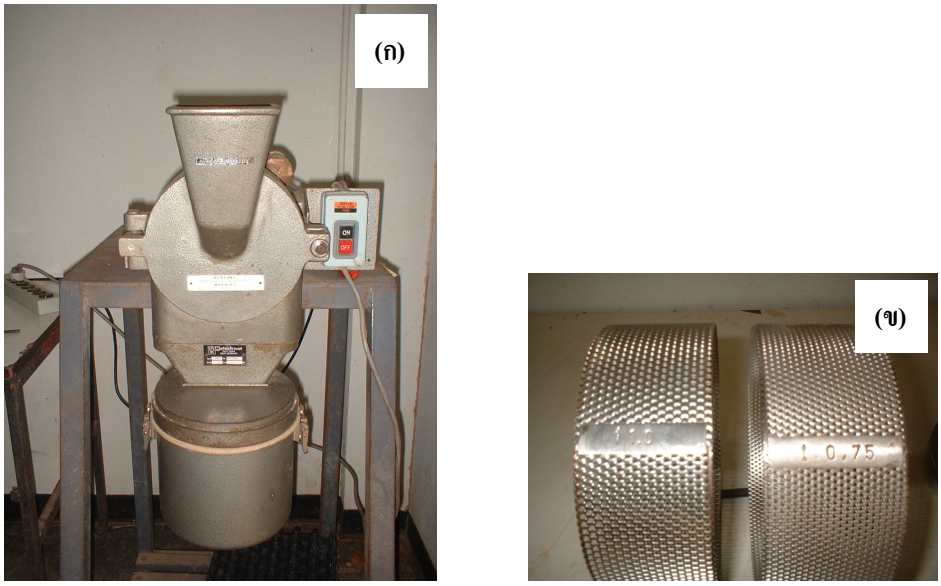
1. Dinitrosalicylic acid (DNS)
2. Phenol
3. Sodium Potassium tartrate (Rochelle salt)
4. Na_2SO_3
5. NaOH (Commercial grad)
6. NaOH (Analytical grad)
7. ปูนขาว ($Ca(OH)_2$)
8. H_2SO_4 96%
9. H_2SO_4 72%
10. Nitrogen gas
11. Water 2 Distillation
12. Ethanol standard
13. HCl
14. Tween-20
15. Decahydronapthalene
16. อะซิโตน หรือแอลกอฮอล์
17. Acid detergent solution

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 ศึกษาการเตรียมเส้นใยปาล์ม

4.1.1 วิธีการเก็บรักษาเส้นใยปาล์ม

นำเส้นใยปาล์มที่เก็บมาจากโรงงานไปผึ่งแดดให้แห้งสนิทประมาณ 2 วัน แล้วใส่ในถุงพลาสติกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่าให้สัมผัสกับความชื้น ข้อควรระวังหลังจากผึ่งแดดให้แห้งสนิทแล้วอุณหภูมิยังสูงอยู่ ควรรอให้ให้อุณหภูมิลดลงก่อน แล้วจึงเก็บใส่ลงถุงพลาสติก



ภาพที่ 22 เครื่องบด Hammer mill (ก) และตะแกรงที่ใช้ในการบดขนาด 1.0 มิลลิเมตร (16 เมช) และขนาด 0.75 มิลลิเมตร (24 เมช)

Figure 22 Hammer mill machine (a) sive size 1.0 mm and (b) sive size 0.75 mm.

4.1.2 ศึกษาการเตรียมเส้นใยปาล์มด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ กับแคลเซียมไฮดรอกไซด์

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณ 30 กรัม เติมสารละลายปริมาณ 300 มิลลิลิตร (1%, 5%, 10%, 15%NaOH, 1%, 5%, 10% 15%$Ca(OH)_2$) นำไปต้มจับเวลาเมื่อสารละลายเริ่มเดือดเป็นระยะเวลาต่างๆ (15, 30, 60 และ 90 นาที) จากนั้น กรองแยกเส้นใยปาล์มออกจากของสารละลาย แล้วล้างเส้นใยปาล์มด้วยน้ำประปาให้สะอาด จนมีพีเอชเป็นกลาง (ตรวจสอบด้วยกระดาษลิสมัต) นำไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักเส้นใยปาล์มที่ได้ แล้วนำไปบดโดยใช้ตะแกรงขนาด 0.75 มิลลิเมตร (24 เมช) ด้วย Hammer mill (ภาพที่ 22) ชั่งน้ำหนักปริมาณ

เส้นใยหลังจากการบด แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส และลิกนินตามวิธี A.O.A.C., 1999 (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) เลือกวิธีการเตรียมที่ทำให้มีปริมาณเซลลูโลสสูงสุด และปริมาณลิกนินลดลงมากที่สุด

4.2 ศึกษาการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

4.2.1 การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสชนิดต่างๆ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสเส้นใยปาล์มที่เตรียมด้วยวิธีจากข้อ 4.1.2 ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้า 3 ชนิด ดังนี้

1. เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma reesei*
2. เซลลูเลสจากเชื้อ *Trichoderma viride*
3. เซลลูเลสจากเชื้อ *Aspergillus niger*

นำเส้นใยปาล์มที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีที่คัดเลือกได้ตามข้อ 4.1.2 แต่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มิลลิเมตร (16 เมช) ปริมาณ 1.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M pH 5.0 ปริมาณ 28 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติมเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 2 มิลลิลิตร (10 FPU/g substrate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ) คัดเลือกเอนไซม์เซลลูเลสที่ทำให้เกิดการไฮโดรไลซีสได้น้ำตาลรีดิวส์ และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเส้นใยปาล์มเป็นน้ำตาลริดิวส์มากที่สุดไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.2.2 การไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเบต้า-กลูโคซิเดสชนิดต่างๆ

คัดเลือกเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซีสได้ดีตามข้อ 4.2.1 นำไปทดสอบประสิทธิภาพการไฮโดรไลซีสร่วมกับการเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณ 1.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M pH 5.0 ปริมาณ 26 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที เติมปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 2 มิลลิลิตร (10

FPU/g substrate) และเติมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ปริมาณ 2 มิลลิลิตร(10 U/g substrate) จะมีสองชนิดคือ

1. เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อ *Aspergiilus niger*

2. เบต้า-กลูโคซิเดสจาก almonds

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ด้วยวิธี DNS Method (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ) คัดเลือกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ทำให้เกิดการไฮโดรไลซีสได้น้ำตาลรีดิวส์ และเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนเส้นใยปาล์มเป็นน้ำตาลริดิวส์มากที่สุดไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.3 การเตรียมเชื้อ *Saccharomyces cerivisiae* เริ่มต้น

เชื้อ *Saccharomyce cerivisiae* TISTR 5596 เก็บไว้บนอาหาร YM agar ที่ 4 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture) เดือนละครั้ง ถ่ายเชื้อจากอาหารแข็งลงในอาหารเหลว (YM broth) ที่มีกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที แล้วปรับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ให้ได้ประมาณ 10^8 เซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาณ 10 %(v/v) ในการเป็นเชื้อเริ่มต้นของระบบ SSF

4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธี SSF โดยใช้เอนไซม์ย่อยในระบบแบบกะ

ทำการทดลองโดยใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Yeast extract 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.03 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร Tween-20 2.5 กรัมต่อลิตร และ เส้นใยปาล์มที่ทำการเตรียมแล้วปริมาณตามข้อ 4.4.1 ในทุกกรณีมีการเติมเอนไซม์จากข้อ 4.2 และเติมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerivisiae* TISTR 5596 10% (v/v) (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยวิธี SSF ดังนี้

4.4.1 ศึกษาปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสม

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณ 4.5 กรัม (90 กรัมต่อลิตร), 5.0 กรัม (100 กรัมต่อลิตร), และ 5.5 กรัม (110 กรัมต่อลิตร) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Citric acid buffer

0.05 M pH 5.0 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร (8 FPU/g substrate), เบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร (8 U/g substrate) เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอล จากนั้นเลือกปริมาณเส้นใยปาล์มที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล และการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M pH 5.0 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร (8 FPU/g substrate), เบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร (8 U/g substrate) เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอล จากนั้นเลือกอุณหภูมิที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล และการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M pH 4.5, pH 5.0 และ pH 5.5 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร (8 FPU/g substrate), เบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร (8 U/g substrate) เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบ

ต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอล จากนั้นเลือกพีเอชที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล และการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.4 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้

ฟลาสก์ 1 เซลลูเลส 6 FPU/g substrate และเบต้า-กลูโคซิเดส 6 U/g substrate

ฟลาสก์ 2 เซลลูเลส 8 FPU/g substrate และเบต้า-กลูโคซิเดส 8 U/g substrate

ฟลาสก์ 3 เซลลูเลส 10 FPU/g substrate และเบต้า-กลูโคซิเดส 10 U/g substrate

เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอล จากนั้นเลือกปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล และการเปลี่ยนแปลงสูง แต่ใช้ปริมาณเอนไซม์ต่ำ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.4.5 ศึกษาสัดส่วนปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส กับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 นำมาทดสอบโดยการลดสัดส่วนของเบต้า-กลูโคซิเดสลงดังนี้

ฟลาสก์ 1. เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 (ควบคุม)

ฟลาสก์ 2. เซลลูเลสที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และเบต้า-กลูโคซิเดสลดลง 2 เท่า

ฟลาสก์ 3. เซลลูเลสที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และเบต้า-กลูโคซิเดสลดลง 3 เท่า

เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณเอทานอล จากนั้นเลือกสัดส่วนปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอล และการเปลี่ยนแปลงสูง แต่ใช้สัดส่วนปริมาณเอนไซม์ต่ำ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอทานอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และข้อ 4.4.5 เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

4.6 ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ Saparate Hydrolysis and Fermentation (SHF)

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 45 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเบ้ตา-กลูโคซิเดส ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และข้อ 4.4.5 เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง กรองแยก นำสารละลายที่ได้ เติม Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

4.7 ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยการไฮโดรไลซีสแบบกะ ที่ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าระบบ SSF

ชั่งเส้นใยปาล์มปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และข้อ 4.4.5 เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

4.8 ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยการไฮโดรไลซีสแบบกึ่งกะ ที่ 50 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าระบบ SSF

ชั่งเส้นใยปาล์มเริ่มต้นปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.1 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Citric acid buffer 0.05 M พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3 ปริมาณ 40 มิลลิลิตร Yeast extract 0.05 กรัม (1.0 กรัมต่อลิตร) $MgSO_4.7H_2O$ 0.00013 กรัม (0.03 กรัมต่อลิตร) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.0025 กรัม (0.5 กรัมต่อลิตร) Tween-20 0.125 กรัม (2.5 กรัมต่อลิตร) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเซลลูเลส 2.5 มิลลิลิตร และเบต้า-กลูโคซิเดส 2.5 มิลลิลิตร ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-กลูโคซิเดส ที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.4 และ 4.4.5 เติม KMS 0.01 กรัม (0.2 กรัมต่อลิตร) ทิ้งไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ในการทดลองที่ 1 เติมเส้นใยปาล์มลงไปเพิ่มปริมาณ 2.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 6 ชั่วโมง ของการไฮโดรไลซีส ปริมาณเส้นใยปาล์มสุดท้ายเป็น 150 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองที่ 2 เติมเส้นใยปาล์มลงไปเพิ่มปริมาณ 2.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 12 ชั่วโมง ของการไฮโดรไลซีส ปริมาณเส้นใยปาล์มสุดท้ายเป็น 150 กรัมต่อลิตร

ในการทดลองที่ 3 เติมเส้นใยปาล์มลงไปเพิ่มปริมาณ 2.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ของการไฮโดรไลซีส โดยมีปริมาณเส้นใยปาล์มเริ่มต้น 2.5 กรัม (50 กรัมต่อลิตร) ปริมาณเส้นใยปาล์มสุดท้ายเป็น 150 กรัมต่อลิตร

จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 5.0 มิลลิลิตร (10%, v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.2 ด้วยอัตราการเขย่า 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ)

วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย t-Test : Two-Sample Assuming Unequal Variances