บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Model BL610, Sartorius, Germany)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Model TC-205, Denver Instrument Company)
3. เครื่องชั่งขนาด 7 กิโลกรัม
4. กล้องจุลทรรศน์ (Model CH30RF200, Olympus, Japan)
5. Vortex (Model Genie 2, Scientific industries)
6. Hot plate (Cimarec 3)
7. Hot plate (Model 210T, Thermix, Fisher Scientific, USA)
8. เครื่องทำความร้อนสำหรับกลั่น (Electromantle, Electrothermal, England)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model Universal 32R, Hettich, Germany)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ (Model B-22M, Thermo IEC, International Equipment Company, USA)
11. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Model NovaSpec 4049, LKB Biochrom, England)
12. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Model PP-50, Sartorius, Germany)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Heto, Heto-Holten, Den Mark)
14. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker, Model G25, New Brunswick Scientific Co.Inc., USA)
15. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker, Lab-Line)
16. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (BINDER, Germany)
17. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (Model IV10000, TEQ)
18. ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร (Model MD-300, B.E. MARUBISHI, Tokyo, Japan)
19. เครื่องบดพอลิเมอร์ (Model Retsch 5657 , HAAN, West-Germany)

20. เครื่องย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรดสำหรับวิเคราะห์ซัลเฟอร์ (Digester 2020, Tecator, A Perstorp Analytical Company)
21. เครื่อง Automatic bomb calorie meter (AC-350, Leco)
22. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Model U50 790,387, Memmert)
23. ตู้อบความร้อนสูง (Hot Air Oven) (Binder)
24. เตาเผาเถ้า (Muffle Furnace, Fisher Scientific)
25. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (TA CHANG, Taichang, Taiwan)
26. ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina flow) (Model B∀T123, ISSCO)
27. เครื่อง Gas liquid chromatography (Model 7AG, Shimadzu) แบบ ionization detector โดยใช้ Porapak Q column
28. เครื่อง HPLC (Model 4100, LDC, USA)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. Sodium lauryl sulfate (APS)
2. Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (APS)
3. Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) (APS)
4. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Merck)
5. 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoehyl ether) (Merck)
6. Sodium Sulfite ($NaSO_3$) (Scharlau)
7. Decahydronaphthalene (Fluka)
8. Acetone (Merck)
9. Sulfuric acid (Merck)
10. Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (SERVA)
11. Potassium permanganate ($KMnO_4$) (Carlo Erba)
12. Silver sulfate (Ag_2SO_4) (Carlo Erba)
13. Ferric nitrate nanohydrate ($Fe(NO_3)_3.9H_2O$) (APS)
14. Silver nitrate ($AgNO_3$) (Merck)
15. Potassium acetate (Scharlau)
16. Acetic acid, glacial (Merck)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17. Tertiary butyl alcohol (Butanol) (APS)
18. Oxalic acid dihydrate (Carlo Erba)
19. 95% Ethanol
20. Hydrochloric acid (HCl) (Merck)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืช

1. Nitric acid (Merck)
2. $HClO_4$ (Merck)
3. $BaCl_2$ (APS)
4. Gum acacia (APS)
5. Ammonium acetate (APS)
6. $CaSO_4.2H_2O$ (APS)

เคมีภัณฑ์สำหรับการเลี้ยงเชื้อราและยีสต์และการผลิตเอนไซม์

1. วุ้นผง
2. Yeast extract (Difco)
3. Mal extract (Difco)
4. Bacto peptone (Difco)
5. D-Glucose (Merck)
6. Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) (Carlo Erba)
7. Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) (Merck)
8. Calcium hydrogenphosphate dihydrate ($CaHPO_4.2H_2O$) (Scharlau)
9. Corn steep liquor (Sigma)
10. α-cellulose (Sigma)
11. Tween 80 (Fluka)
12. Ferrous sulfate ($FeSO_4$) (M & B)
13. Zinc sulfate ($ZnSO_4$) (M & B)
14. Manganese sulfate ($MnSO_4$) (Carlo Erba)

15. Cobalt chloride ($CoCl_2$) (M & B)
16. Calcium chloride (Scharlau)

เคมีภัณฑ์สำหรับการวัดปริมาณเอนไซม์และโปรตีน

1. 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) (Sigma)
2. Sodium bisulfite ($NaHSO_3$) (M & B)
3. Sodium potassium tartrate (Carlo Erba)
4. D-salicin (Fluka)
5. D-glucose monohydrate (Merck)
6. Phenol (C_6H_6O) (Merck)
7. Sodium hydroxide (Mallinckrodt)
8. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$) (APS)
9. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1)
10. D-xylose (Fluka)
11. Ammonium molybdate
12. $Na_2HaSO_4.7H_2O$
13. $NaH_2PO_4.2H_2O$
14. $Na_2HPO_4.2H_2O$

เคมีภัณฑ์สำหรับการเตรียมบัฟเฟอร์

1. Citric acid ($C_3H_4(OH)(COOH)_3$) (APS)
2. Trisodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.H_2O$) (APS)
3. Acetic acid, glacial (Merck)
4. Sodium acetate (Merck)
5. Sodium hydroxide (Mallinckrodt)
6. Hydrochloric acid (Merck)
7. Sodium sulfate
8. Sodium carbonate (M&B)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและการเก็บตัวอย่างวัชพืช

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างวัชพืช 10 ชนิด ซึ่งเจริญอยู่ในพื้นที่รกร้างและริมถนน โดยเลือกเฉพาะวัชพืชที่มีลักษณะต้นสูงมากกว่า 1 เมตร นำตัวอย่างวัชพืชที่ได้มาตรวจสอบเพื่อหาชื่อวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของวัชพืชได้ดำเนินตามหลักการของ Dichotomous Key โดยหนังสือที่ใช้ในประกอบในการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ คือ The Grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan Vol. 1 ปี 1960 ของ N. L. Bor

2. การหาผลผลิตชีวมวลและปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืช

ศึกษาผลผลิตชีวมวลของวัชพืชแต่ละชนิดจากความหนาแน่นต่อพื้นที่ในหน่วยกิโลกรัมต่อตารางเมตร โดย

2.1 กั้นพื้นที่ที่มีวัชพืชแต่ละชนิดเจริญอยู่ แบ่งเป็น 3 แปลง (3 ซ้ำ) ขนาด 1x1 เมตร

2.2 ตัดส่วนเหนือดินของวัชพืชแต่ละชนิดในแต่ละแปลง ชั่งน้ำหนักสด และหาค่าเฉลี่ย

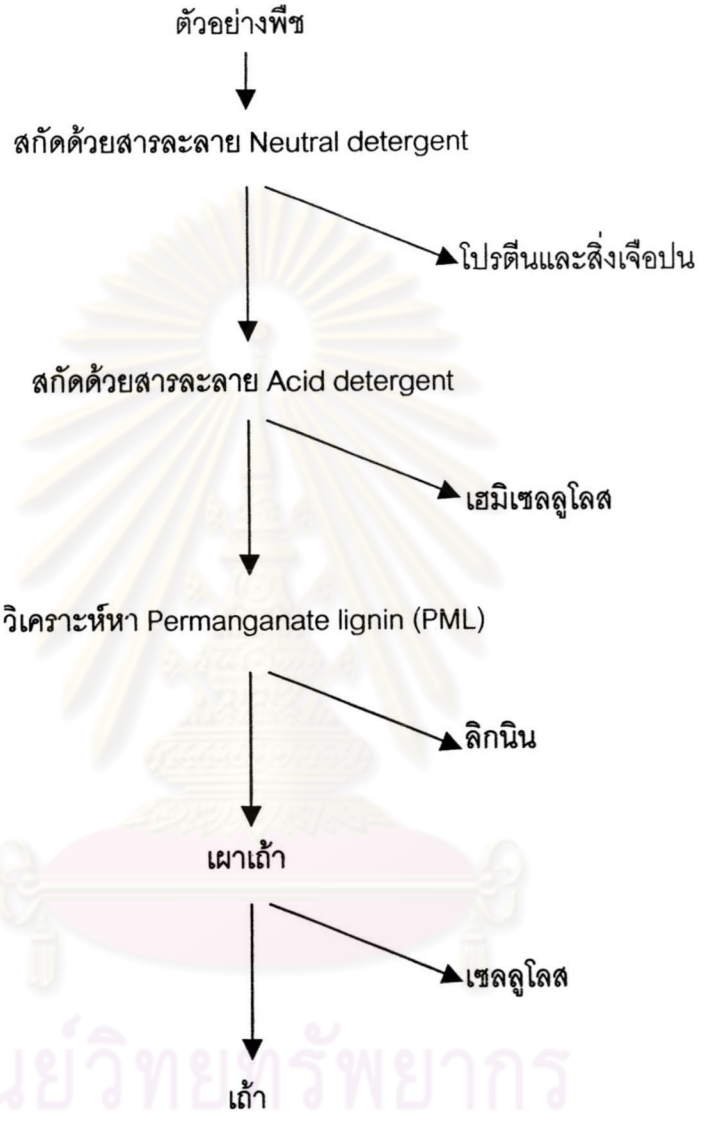
2.3 นำตัวอย่างที่ได้มาอบแห้งด้วยตู้อบ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง และหาค่าเฉลี่ย

คำนวณหาปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืช (Moisture content at harvest in plant) ได้จาก

$$\text{ปริมาณความชื้นขณะเก็บเกี่ยวในพืช} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักสด}}$$

3. การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลในวัชพืชแต่ละชนิด ซึ่งได้แก่ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) (ภาคผนวก ค) ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ขั้นตอนโดยย่อในการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การหาปริมาณกำมะถันในชีวมวลพืช

นำตัวอย่างวัชพืชแต่ละชนิดไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วทำการย่อยตัวอย่างแบบเปียก (Wet digestion) ด้วยกรดไนตริกและกรดเปอร์คลอริก ตามวิธีของ Oweczkin และ Kerven (1980) (ภาคผนวก ค) จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการย่อยด้วยกรดมาวิเคราะห์หาปริมาณกำมะถัน ตามวิธีของ Chapman และ Pratt (1961) (ภาคผนวก ค)

5. การหาปริมาณเถ้าในชีวมวลพืช

นำตัวอย่างวัชพืชแต่ละชนิดไปอบในตู้อบเช่นเดียวกับในข้อ 4 จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าในชีวมวลของวัชพืชแต่ละชนิดโดยการเผาเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1984) โดยชั่งตัวอย่างพืชใส่ใน porcelain crucible 1 กรัม แล้วนำไปเผาในเครื่องเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก คำนวณปริมาณเถ้าเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

6. การหาค่า heating value ของชีวมวลพืช

นำตัวอย่างวัชพืชแต่ละชนิดไปอบในตู้อบเช่นเดียวกับในข้อ 4 ชั่งตัวอย่างพืช 1 กรัม ใส่ในถ้วยสำหรับเผา เติมก๊าซออกซิเจน 430 psig แล้วนำใส่ลงในเครื่อง Bomb calorie meter เสียบขั้ว electrode เผาเป็นเวลา 5 นาที ค่า heating value ที่ได้จะมีหน่วยเป็น แคลอรีต่อกรัม ซึ่งสามารถแปลงเป็นหน่วยจูล (J) ได้โดยการคูณด้วย 4.184 (Nelson and Cox, 2000)

7. การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อราที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ *Acrophialophora* sp. (wild type) ซึ่งเป็นราที่คัดแยกได้จากดินบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ คัดแยกโดย พรเทพ ถนนแก้ว (2538) *Acrophialophora* sp. UV10-2 และ *Acrophialophora* sp. UV10-7 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดย พิสุทธิ์ พวงนาค (2542) เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้รับจากห้องปฏิบัติการ Plant Biomass Utilization ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตร Production ที่มี α-cellulose 3% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน (Punnapayak and Emert, 1986) (ภาคผนวก ก) เพื่อผลิตเอนไซม์ โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง

ขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Production ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้เขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน นำมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที (7441.4 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยวัดแอคติวิตีของ exoglucanase และ endoglucanase ตามวิธีของ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987) วัดแอคติวิตีของ β-glucosidase ตามวิธีของ Sternberg, Vijaykumar และ Reese (1977) (ภาคผนวก ง)

8. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB)

เมื่อทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อราและจำนวนวันในบ่มเชื้อที่ให้แอคติวิตีของเซลลูเลสที่ดี จึงนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหารสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้ผลิตหัวเชื้อที่เรียกว่า seed culture สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ปริมาณมากที่ใช้ในการหมัก เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากเชื้อรา 3 ชนิดที่ได้ตรวจสอบ แอคติวิตีของเอนไซม์แล้วในอาหารสูตร PDA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร PDB โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่เต็มด้วย cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน

เก็บผลทุก 2 วัน นำมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เอาแต่เส้นใย ล้างเส้นใยด้วย normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา และหาค่า maximum specific growth rate (ภาคผนวก จ)

9. การศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 ซึ่งได้รับจาก Prof. Dr. Rodney J. Bothast (USDA) ศึกษาการเจริญของยีสต์ในอาหารสูตร Yeast Malt Broth (YMB) (ภาคผนวก ก) โดยเขี่ยเชื้อจำนวน 2 loop เต็ม ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร YMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบควบอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เมื่อยีสต์เจริญจนมีความเข้มข้นของ

เซลล์ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรเดียวกัน โดยใช้หัวเชื้อปริมาตร 5% (v/v) จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน

เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมง นำมา กรองเอาแต่เซลล์โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างเซลล์ด้วย normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง แล้วนำค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา และหาค่า maximum specific growth rate (ภาคผนวก จ)

10. การหาความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เริ่มต้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

เลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารสูตร YMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยใช้เชื้อที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงสุด เตรียมหัวเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ต่างกัน คือ 10^8 10^9 และ10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร YMB ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 5% (w/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 125 รอบต่อนาที

เก็บผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน วัด pH และนับจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก จ) จากนั้นนำมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที (2906.8 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GC) โดยใช้ Porapak Q column แบบ ionization detector แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล (ภาคผนวก ฉ) วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือด้วยการวัด reducing sugar โดยใช้วิธี DNS Assay (Miller,1959) (ภาคผนวก ฉ)

11. การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

11.1 <u>การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส</u>

เมื่อทราบผลการทดลองในข้อ 7 จึงเลือกสายพันธุ์ของ *Acrophialophora* sp. ที่มีแอคติวิตีของเซลลูเลสที่ดีและเหมาะที่จะใช้ในกระบวนการ SSF มาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร โดยเลี้ยงในอาหารสูตร Production ภายใต้สภาวะเดียวกับการบ่มเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในข้อ 7 แต่เปลี่ยนจากการใช้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่เต็มเป็นหัวเชื้อมาเป็นการใช้ seed culture เนื่องจากต้องใช้หัวเชื้อปริมาณมาก seed culture ที่ใช้จะมีระยะการเจริญ

อยู่ในช่วง log phase (ผลการทดลองได้จากข้อ 8) ใช้ seed culture ปริมาตร 10% (v/v) บ่มเชื้อในอาหารสูตร Production โดยเก็บผลในวันที่มีค่าแอคติวิตีที่ดีที่สุดของเซลลูเลสทั้ง 3 องค์ประกอบ (ผลการทดลองได้จากข้อ 7) นำมาวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส และวัดแอคติวิตีของไซแลนเนส ตามวิธีของ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose and Bisaaria, 1987) (ภาคผนวก ง)

11.2 การปรับสภาพพืช (Pretreatment)

ทำการปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพทำได้โดยนำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมาตัดให้เป็นชิ้นๆ ขนาดยาวประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดพอลิเมอร์ ขนาดตะแกรงบด 0.1 เซนติเมตร จากนั้นนำมาปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีตามวิธีของ Punnapayak และ Hoffmann (1994) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% (w/v) ในอัตราส่วน 2 : 1 (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ : ตัวอย่างพืช) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านจนกระทั่งมีค่า pH เท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยแช่ใน 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 แล้วแช่ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืนก่อนนำมาใช้ในการหมักตัวอย่างพืชที่ผ่านการปรับสภาพแล้วให้นำมาวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

11.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เลี้ยงยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ในอาหารสูตร YMB โดยเขี่ยเชื้อจำนวน 2 loop เต็ม ถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร YMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เมื่อยีสต์เจริญจนเข้าสู่ภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด (ผลการทดลองจากข้อ 9) ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรเดิมแต่ขยายขนาดการผลิตเป็นระดับฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร โดยใช้เชื้อปริมาตร 5% (v/v) เมื่อยีสต์เจริญจนเข้าสู่ภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด นำมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที (3521.7g, r = 12.6 cm) เพื่อแยกเอาแต่เซลล์ ล้างเซลล์โดยการ centrifuge 2 ครั้ง ด้วย 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 หรือ normal saline เข้มข้น 0.85% (w/v) เมื่อได้เซลล์ยีสต์แล้วให้นำมาเจือจางด้วยอาหารสูตร Production นับจำนวนเซลล์จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการหมัก (ผลการทดลองจากข้อ 10)

11.4 การหมักในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

ชั่งวัชพืชแต่ละชนิดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 3 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม

F2 medium (Punnapayak et al., 1999) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมาเติมเอนไซม์เซลลูเลส 75 มิลลิลิตร และเติมยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยอะลูมินัมฟอยล์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก (ผลการทดลองได้จากข้อ 10) ความเร็วรอบในการเขย่า 125 รอบต่อนาที

เก็บผลการทดลองในวันที่ 3 5 และ 7 นำมาวัดค่า pH และนับจำนวนเซลล์ จากนั้นนำมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที (2906.8 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GC) โดยใช้ Porapak Q column แบบ ionization detector แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล วัดปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี DNS Assay วัดปริมาณกลูโคส ไซโลส และเซลโลไบโอส ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart-NH_2 ขนาด 250 x 4.0 มิลลิเมตร ใช้ 85% acetonitrile ในน้ำ เป็น mobile phase และใช้ Refractive Index Detector นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแต่ละชนิด (ภาคผนวก ฉ) ส่วนกากที่เหลือจากการหมักนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง หลังจากหักลบน้ำหนักเซลล์ยีสต์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์ (ภาคผนวก ฉ) น้ำหนักที่ได้คือน้ำหนักโดยประมาณของกากพืชที่เหลือจากการย่อยสลายและการหมัก

11.5 <u>การหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร (batch process)</u>

เมื่อทราบผลการหมักในระดับฟลาสก์แล้ว เลือกวัชพืชที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดมาใช้หมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ปรับสภาพพืชตามวิธีในข้อ 11.2 ในการหมักใช้พืช 5% (w/v) เอนไซม์เซลลูเลส 75% (v/v) 0.04 M sodium acetate buffer pH 5.0 5% (v/v) F2 medium 10% (v/v) และยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 10%(v/v) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดียวกับการหมักในระดับฟลาสก์ ความเร็วรอบในการกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที ให้อากาศ 0.5 vvm ต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักบันทึกค่า pH นับจำนวนเซลล์ยีสต์ แล้วนำน้ำหมักมา centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที (2906.8 g, r = 10.4 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GC) วัดปริมาณ reducing sugar ด้วยวิธี DNS วัดปริมาณกลูโคส ไซโลส และเซลโลไบโอส ด้วยเครื่อง HPLC

11.6 การกลั่น

นำส่วนน้ำหมักที่ได้จากการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ไปกลั่นแบบ Simple distillation โดยใช้คอลัมน์แก้ว และเก็บของเหลวที่ได้จากกลั่นไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas liquid chromatography (GC)

12. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลองมีการวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) นำข้อมูลที่ได้จากทุกการทดลองซึ่งทำ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้ค่านัยสำคัญที่ระดับ 0.05 พร้อมทั้งเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยค่า LSD (Least Significant Difference) และ Homogeneous subsets (Duncan)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย