# บทที่ 3

# วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

## วัสดุอุปกรณ์

| วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์ | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| ตู้เขี่ยเชื้อแบบ larminar flow รุ่น BAT123 | ISSCO, USA |
| เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610 | Sartorius, Germany |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205 | Denver Instrument Company, USA |
| เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | Analytical Sartorius, Germany |
| เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Nova Spec 4049 | LKB Biochrom, England |
| เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) รุ่น G25 | New Brunswick Science, USA |
| เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) | Lab-Line, USA |
| อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) | Heto-Holten, Den Mark |
| อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) | Grant Instrument, England |
| เครื่องบดพอลิเมอร์ รุ่น Retsch 5657 | B. E. Marubishi, Japan |
| เครื่องปั่นน้ำผลไม้ | National, Japan |
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (steam sterilizer/ autoclave) | Ta Chang Medical Instrument Factory, Taiwan |
| เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R | Hettich, Germany |
| เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-22m | International Equipment Company, USA |
| ตู้อบ (oven) | Memmert, Germany |
| ตู้อบ | Griffin, USA |

| วัสดุอุปกรณ์/ครุภัณฑ์ | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 | Olympus, Japan |
| เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ion analyzer 255 | Corning, USA |
| เตาเผาเถ้า (muffle furnace) | Fisher Scientific, USA |
| Hot plate รุ่น 210T | Fisher Scientific, USA |
| Vortex รุ่น Genie 2 | Scientific industries, USA |
| ปิเปตอัตโนมัติขนาด 250 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร | Brand Gmbh + Co, Germany |
| ครูซิเบิ้ล แบบ sintered glass crucible เบอร์ 1, 3 และแบบ porcelain crucible | Schott Duran, Germany |
| ชุดเครื่องแก้ว pyrex | Pyrex, USA |
| ชุดเครื่องแก้ว duran | Schott Duran, Germany |
| กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 | Whatman International, England |
| กระบอกตวงที่มีฝาปิด (graduated cylinder) | Pyrex, USA |
| ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทและล็อกฝาได้ และผ้ากรอง | ศึกษาภัณฑ์ ประเทศไทย |
| เครื่อง gas liquid chromatography รุ่น 7AG แบบ ionization detector โดยใช้ Porapak Q column | Shimadzu, Japan |

**สารเคมี**

| ชนิด | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| วุ้นผง (agar) | พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์ ประเทศไทย |
| Ethanol 95% ($C_2H_5OH$) | องค์การสุรา กรมสรรพสามิต จ.ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย |
| Silicone oil | วิทยาศรม ประเทศไทย |
| Sodium hypochlorite (NaOCl) | Ajax. Fine chem., Australia |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| ชนิด | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| Calcium chloride ($CaCl_2$)<br>Calcium hydrogen phosphate dihydrate<br>($CaHPO_4 . 2H_2O$)<br>Sodium sulfite ($NaSO_3$) | Scharlau, Spain |
| Bacto peptone<br>Malt extract<br>Yeast extract | Bacto Difco, USA |
| Cobalt chloride ($CoCl_2$)<br>Ferrous sulphate ($FeSO_4$)<br>Manganese sulphate ($MnSO_4$)<br>Sodium bisulfite ($NaHSO_3$)<br>Zinc sulphate ($ZnSO_4$) | MAY & BAKER, England |
| Citric acid ($C_6H_2O_7.2H_2O$)<br>di-Sodium ethylendiaminetetraacetate<br>(EDTA) dihydrate<br>($CH_2.N(CH_2.COOH).CH_2.COONa)_2.2H_2O$<br>Ferric nitrate nonahydrate ($(FeNO_3)_3.9H_2O$)<br>Potassium acetate ($CH_3COOK$)<br>Sodium borate decahydrate<br>($Na_2B_4O_7.10H_2O$)<br>Sodium lauryl sulphate ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) | Asia Pacific Specialty Chemicals, Australia |
| α-cellulose, fibrous<br>Carboxymethylcellulose (CMC)<br>Cornsteep liquor<br>D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)<br>3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)<br>di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous<br>($Na_2HPO_4$) | Sigma Chemical, USA |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

| ชนิด | บริษัท/ประเทศ |
|---|---|
| 2-Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) ($C_4H_{10}O_2$)<br>Hydrochloric acid (HCl)<br>Hydrogen peroxide ($H_2O_2$)<br>Manganese sulphate ($MnSO_4$)<br>Phenol ($C_6H_6O$)<br>Silver nitrate ($AgNO_3$)<br>Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa.3H_2O$)<br>Sodium chloride (NaCl)<br>Sodium hydroxide (NaOH)<br>Sulfuric acid ($H_2SO_4$) | Merck, Germany |
| Copper sulphate ($CuSO_4.5\ H_2O$)<br>Iron (II) ammonium sulphate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6\ H_2O$)<br>Iron (II) sulphate ($FeSO_4.\ 7H_2O$)<br>Magnesium sulphate ($MgSo_4.7H_2O$)<br>Oxalic acid dihydrate $(COOH)_2.2H_2O$<br>Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)<br>Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$)<br>Potassium permanganate ($KMnO_4$)<br>Potassium sodium tartrate , Rochelle salt ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$)<br>Silver sulphate ($AgSO_4$) | Carlo Erba, Italy |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 ตัวอย่างวัชพืชที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างวัชพืชแห้งจำนวน 8 ชนิดที่มีลักษณะต้นสูงมากกว่า 1 เมตร ซึ่งเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 8 จังหวัด คือ จังหวัดนครปฐม กรุงเทพฯ สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ปทุมธานี ลำพูน และนครราชสีมา แล้วตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักการของ Dichotomous Key โดยหนังสือที่ใช้ประกอบในการจัดจำแนก คือ The Grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan Vol.1 ปี1960 ของ N. L. Bor มีดังนี้

(1) ลำเอียก (*Coix aquatica* Roxb.)

(2) หญ้าคา (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.)

(3) หญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum polystachyon* (L.) Schult)

(4) หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schumach)

(5) แขม (*Phragmites karka* (Retz.) Trin. ex Steud.)

(6) เลา (*Saccharum spontaneum* Linn.)

(7) ก๋ง (*Thysanolaena maxima* (Roxb.) O. Ktze.)

(8) ธูปฤาษี (*Typha angustifolia* Linn.)

### 3.2 การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช (Goering and Van Soest, 1970)

นำวัชพืชแห้งแต่ละชนิดที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดพอลิเมอร์แล้วมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ Neutral detergent fiber (NDF), Acid detergent fiber (ADF) และ Permanganate lignin (PML) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบชีวมวลของพืช

#### 3.2.1 การวิเคราะห์หา Neutral detergent fiber (NDF)

3.2.1.1 นำครูซิเบิ้ล (sintered glass crucible) เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ล้างสะอาดแล้วไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

3.2.1.2 นำตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบ ซึ่งผ่านการทำให้แห้ง และบดละเอียดขนาดประมาณ 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตรแล้ว ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร จำนวน 0.5 ถึง 1.0 กรัม

3.2.1.3 เติมสารละลาย neutral detergent fiber ปริมาตร 100 มิลลิลิตร sodium sulfite anhydrous ( $Na_2SO_3$ ) จำนวน 0.5 กรัม และ decahydronaphthalene reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ดังแสดงในภาคผนวก ค คนให้เข้ากัน นำไปต้มให้เดือด แล้วปรับอุณหภูมิให้ลดลงเล็กน้อย จากนั้นจึงรีฟลักซ์ต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

3.2.1.4 ถ่ายส่วนผสมที่รีฟลักซ์เสร็จแล้วลงในครูซิเบิ้ลที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ลด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1,200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลายที่ใช้ออกจนหมด

3.2.1.5 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ลด้วยอะซิโตนจำนวน 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี

3.2.1.6 นำครูซิเบิ้ลไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

3.2.1.7 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักของครูซิเบิ้ล คือ ปริมาณ NDF

**3.2.2 การวิเคราะห์หา Acid detergent fiber (ADF)**

3.2.2.1 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย neutral detergent มาถ่ายใส่ในบีกเกอร์ เพื่อทำการรีฟลักซ์ด้วย acid detergent โดยเติม acid detergent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ decahydronaphthalene reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเริ่มนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

3.2.2.2 กรองตัวอย่างพืชในครูซิเบิ้ลใบเดิมเพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 ถึง 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1,200 มิลลิลิตร หรือจนกว่าจะไล่สารละลายที่ใช้ออกจนหมด

3.2.2.3 ล้างตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ลด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี

3.2.2.4 นำครูซิเบิ้ลไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

3.2.2.5 น้ำหนักที่ได้ก็คือ น้ำหนักของ ADF ดังนั้นสามารถคำนวณหาปริมาณของเฮมิเซลลูโลสได้ ด้วยน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง NDF และ ADF

**3.2.3 การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)**

3.2.3.1 เติมสารละลาย combined permanganate ดังแสดงในภาคผนวก ค ประมาณ 25 มิลลิลิตร หรือให้ท่วมตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ลซึ่งผ่านการสกัดด้วย acid detergent แล้ว แช่ครูซิเบิ้ลลงในถาดโลหะสแตนเลสที่มีน้ำเย็นบรรจุอยู่ สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ใช้แท่งแก้วคนตัวอย่างให้กระจายไม่จับตัวเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ

3.2.3.2 เติมสารละลาย combined permanganate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร อีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ

3.2.3.3 เติมสารละลาย demineralizing ดังแสดงในภาคผนวก ค ลงไปให้ท่วมตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ล ระวังอย่าให้เป็นฟอง ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ โดยถ้าตัวอย่างพืชที่อยู่ในครูซิเบิ้ลยังเป็นสีน้ำตาลเข้มให้ทำซ้ำอีกจนกระทั่งตัวอย่างพืชเป็นสีขาว ภายในเวลา 20 นาที

3.2.3.4 ล้างตัวอย่างพืชที่ในครูซิเบิ้ล ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 ครั้ง

3.2.3.5 ล้างตัวอย่างพืชที่ในครูซิเบิ้ลด้วยอะซิโตนประมาณ 2 ครั้ง และดูดสารละลายออกให้แห้งด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ

3.2.3.6 นำครูซิเบิ้ลไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก

3.2.3.7 น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักของ ADF และน้ำหนักของตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดเอาลิกนินออกแล้ว (PML) คือ ปริมาณของลิกนิน

**3.2.4 การหาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า**

นำตะกอนจากข้อ 3.2.3.7 มาเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก โดยน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างน้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการสกัดลิกนินออก (PML) และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าก็คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาเถ้าและน้ำหนักครูซิเบิ้ล

### 3.2.5 การคำนวณหาค่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

**ปริมาณ NDF** (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

[ (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนัก NDF) – น้ำหนักครูซิเบิ้ล ] × 100 / น้ำหนักแห้งตัวอย่าง

**ปริมาณ ADF** (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

[ (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนัก ADF ) – น้ำหนักครูซิเบิ้ล ] × 100 / น้ำหนักแห้งตัวอย่าง

**ปริมาณเฮมิเซลลูโลส** (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

ปริมาณ NDF (เปอร์เซ็นต์) – ปริมาณ ADF (เปอร์เซ็นต์)

**ปริมาณลิกนิน** (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

[ (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนัก ADF ) – (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนัก PML ) ] × 100 / น้ำหนักแห้งตัวอย่าง

**ปริมาณเซลลูโลส** (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ

[ (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนัก PML ) – (น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนักเถ้า) ] × 100 / น้ำหนักแห้งตัวอย่าง

### 3.3 การหาปริมาณเถ้าในชีวมวล (AOAC, 1984)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างวัชพืชแห้งที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบดพอลิเมอร์ โดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 1.0 มิลลิเมตร จำนวน 1 กรัม ใส่ลงในครูซิเบิ้ล (porcelain crucible) แล้วนำไปเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณปริมาณเถ้าเป็นร้อยละ

<u>การคำนวณ</u>

ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์) = น้ำหนักเถ้า × 100 / น้ำหนักแห้งตัวอย่าง (กรัม)

### 3.4 การผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียด (โสภณ และคณะ, 2541)

ผลิตเยื่อเซลลูโลสละเอียดจากวัชพืชแห้ง 8 ชนิด เพื่อใช้เป็นแหล่งของเซลลูโลสในการผลิตเซลลูเลส

#### 3.4.1 การเตรียมตัวอย่างวัชพืช

3.4.1.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างวัชพืชแห้งแต่ละชนิดที่ผ่านการบดแล้ว จำนวน 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1,500 มิลลิลิตร (liquor : material ratio = 30 :1)

3.4.1.2 เติมกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1-2 หยด

3.4.1.3 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พร้อมกวน เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.4.1.4 เมื่อครบเวลา ให้นำตัวอย่างวัชพืชมากรองด้วยผ้าขาวบาง ล้างด้วยน้ำ 1-2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท

**3.4.2 การเตรียมเยื่อเซลลูโลส**

3.4.2.1 ชั่งตัวอย่างวัชพืชแต่ละชนิด 30 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร (liquor : material ratio = 20 : 1)

3.4.2.2 ทำ alkali boiling โดยวิธีรีฟลักซ์ ที่อุณหภูมิ 165 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ silicone oil bath

3.4.2.3 กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.4.2.4 ชั่งเยื่อเซลลูโลสที่ได้หลังจากการรีฟลักซ์แล้ว ใส่ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิด

3.4.2.5 ทำการฟอกโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเยื่อ (liquor : material ratio = 20 :1) ปรับให้มีค่า pH ประมาณ 9-11 ปิดฝาแล้วกวนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

3.4.2.6 กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่น

3.4.2.7 ทำ alkali extraction โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเยื่อ (liquor : material ratio = 20 : 1) ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่น

3.4.2.8 ฟอกด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์อีกครั้ง

3.4.2.9 ทำ alkali extraction

3.4.2.10 ฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 7 กรัม/ลิตร โดยน้ำหนักเยื่อ (liquor : material ratio = 15 : 1) ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ปรับให้มีค่า pH ประมาณ 9-11 จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และล้างด้วยน้ำกลั่น

3.4.2.11 ฟอกด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซ้ำอีกสองครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วนำมาบดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ จะได้เยื่อเซลลูโลสที่ละเอียด

**3.5 การหาปริมาณความชื้นในเยื่อเซลลูโลสละเอียด** (TAPPI, 1997)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเยื่อเซลลูโลสละเอียดประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดชั่งอ่านค่าทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยไม่ต้องปิดฝา เมื่อครบตามกำหนดเวลาแล้ว นำไปใส่ในโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างไปอบต่ออีก 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่

<u>การคำนวณ</u>

ความชื้น (เปอร์เซ็นต์) = (น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ – น้ำหนักหลังอบ) × 100 / น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

**3.6 การหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และแกมม่า-เซลลูโลส** (TAPPI, 1997)

เนื่องจากความเข้มข้นแบบนอร์มอลิตี้ (normality) ของสารละลายหลายชนิดที่ใช้สำหรับหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส เบต้า-เซลลูโลส และแกมม่า-เซลลูโลส ไม่เสถียร จึงต้องมีการตรวจสอบความเข้มข้นของสารเหล่านี้ คือ 17.5% NaOH ที่ความเข้มข้น 5.21 ± 0.005 N สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 0.5 N และสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 N ก่อนการทดลองทุกครั้ง และต้องมีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standardization) เพื่อการทดสอบด้วย ดังแสดงในภาคผนวก ค

**3.6.1 การหาปริมาณแอลฟา-เซลลูโลส**

3.6.1.1 อบครูซิเบิ้ล (sintered glass crucible) เบอร์ 3 ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนักไว้ด้วย และนำตัวอย่างที่ผ่านการฟอกแล้วจำนวน 5 กรัม มาอบให้แห้ง จากนั้นชั่งน้ำหนักประมาณ 1.5±0.1 กรัม โดยอ่านค่าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.6.1.2 นำตัวอย่างเยื่อเซลลูโลสละเอียด ใส่ลงในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 300 มิลลิลิตร ซึ่งแช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เติม 17.5% NaOH ปริมาณ 75 มิลลิลิตร บันทึกเวลาที่เริ่มเติมสาร จากนั้นใช้เครื่องกวนหรือแท่งแก้ว กวนสารอย่างช้าๆ จนกระจายทั่วกันดี (ระวังการเกิดฟอง)

3.6.1.3 ยกเครื่องกวนขึ้น ล้างด้วย 17.5% NaOH ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ กวนต่อด้วยแท่งแก้ว

3.6.1.4 เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที นับจากที่เติมสารครั้งแรก ให้เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแก้ว

3.6.1.5 แช่บีกเกอร์ในอ่างน้ำ (25 องศาเซลเซียส) ต่อไปอีก 30 นาที

3.6.1.6 เมื่อครบกำหนดเวลา ให้กวนเยื่อด้วยแท่งแก้ว แล้วเทผ่านครูซิเบิ้ลแก้ว เบอร์ 3 ที่ผ่านการอบแล้ว โดยทิ้ง pulp filtrate ปริมาตร 10-20 มิลลิลิตรแรกไป แล้วเก็บ pulp filtrate ที่เหลือประมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ไว้

3.6.1.7 ปิเปต pulp filtrate มา 25 มิลลิลิตร และเติม 0.5 N $K_2Cr_2O_7$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมกับแกว่งฟลาสก์ไปด้วย

3.6.1.8 ปล่อยให้สารละลายร้อนอยู่เช่นนั้นประมาณ 15 นาที จึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง หยด ferroin indicator จำนวน 2-3 หยดลงไป

3.6.1.9 ไทเทรตด้วย 0.1 N ferrous ammonium sulfate จนได้สารละลายสีม่วงอมน้ำตาลแดง โดยเตรียมแบลงค์ (blank) ด้วยการใช้ 17.5% NaOH ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร แทน pulp filtrate

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{แอลฟา-เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)} = 100 - 6.85\,(V_2 - V_1) \times N \times 20 / A \times W$$

โดยที่

$V_1$ = ปริมาตร titrant ที่ใช้ในการไทเทรต กับ pulp filtrate, ml

$V_2$ = ปริมาตร titrant ที่ใช้ในการไทเทรต กับ blank, ml

N = นอร์มอลิตี้ที่แน่นอนของสารละลาย ferrous ammonium sulfate

A = ปริมาตรของ pulp filtrate ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา oxidation, ml

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง, กรัม

**3.6.2 การหาปริมาณเบต้า-เซลลูโลส**

3.6.2.1 ปิเปต pulp filtrate มา 50 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกตวงที่มีฝาปิด (graduated cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.6.2.2 แช่กระบอกตวงที่มีฝาปิดซึ่งมีส่วนผสมดังกล่าว ลงในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของเบต้า-เซลลูโลส

3.6.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที (1860.4 g, r =10.4 cm) อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บเฉพาะส่วนใสไว้ใช้สำหรับการไทเทรต

3.6.2.4 ปิเปตสารละลายส่วนใสที่ได้ในข้อ 3.6.2.3 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติม 0.5 N $K_2Cr_2O_7$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร พร้อมกับแกว่งฟลาสก์ไปด้วย

3.6.2.5 ปล่อยให้สารละลายร้อนอยู่เช่นนั้นประมาณ 15 นาที จึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง หยด ferroin indicator จำนวน 2-3 หยดลงไป

3.6.2.6 ไทเทรตด้วย 0.1 N ferrous ammonium sulfate จนได้สารละลายสีม่วงอมน้ำตาลแดง ส่วนแบลงค์เตรียมโดยใช้ 17.5% NaOH ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 3 N ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แทนสารละลายส่วนใสที่ได้ในข้อ 3.6.2.3

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{แกมม่า-เซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)} = [6.85\ (V_4 - V_3) \times N \times 20] / 25 \times W$$

โดยที่

$V_3$ = ปริมาตร titrant ที่ใช้ในการไทเทรต กับ pulp filtrate, ml

$V_4$ = ปริมาตร titrant ที่ใช้ในการไทเทรต กับ blank, ml

$$\text{เบต้าเซลลูโลส (เปอร์เซ็นต์)} = 100 - (\%\ \text{แอลฟา-เซลลูโลส} + \%\ \text{แกมม่า-เซลลูโลส})$$

**3.7 การผลิตเซลลูเลส**

เชื้อราที่ใช้ในงานวิจัย คือ *Trichoderma reesei* Rut C-30 ซึ่งได้รับจากหน่วยปฏิบัติการการใช้ประโยชน์จากชีวมวลของพืช โดยเลี้ยงเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ดังแสดงในภาคผนวก ข เพื่อให้เส้นใยเจริญ จากนั้นจึงใช้แท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยของเชื้อรา จำนวน 5 ชิ้น นำมาใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Production ( Punnapayak *et al.* ,1999) ดังแสดงในภาคผนวก ข (มี α-cellulose 3%(w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน) ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Production ที่มีวัชพืช 8 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารสูตร Production ที่มีเยื่อ

เซลลูโลสละเอียดจากวัชพืช 8 ชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อผลิตเอนไซม์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใน แต่ละฟลาสก์ ทำการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็น ระยะเวลา 7 วัน จึงเก็บเอนไซม์โดยการนำมาปั่นหมุนเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที (4185.8 g, r =10.4 cm) เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส เพื่อนำไปวัดค่าแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (Ghose, 1987) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase)(Ghose,1987) เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) (Sternberg, Vijayakumar and Reese,1976) และปริมาณโปรตีน (Gornall, Bardawill and David,1949)

### 3.8 การวัดแอคติวิตีของเซลลูเลส

นำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาตรวจสอบแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่ม และปริมาณโปรตีน

**3.8.1 การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา FPA (Ghose, 1987)**

3.8.1.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.8.1.2 เติมสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 4.8 ดังแสดงในภาคผนวก ค ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 1.0 × 6.0 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

3.8.1.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.8.1.4 เติมสารละลาย DNS reagent ในภาคผนวก ข ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.8.1.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme จากสูตรมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก ง

**3.8.2 การวัดปริมาณแซลลูเลสในกลุ่มเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) โดยการวิเคราะห์หา CMCase (Ghose, 1987)**

3.8.2.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.8.2.2 เติมสารละลาย CMC เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์

0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.8.2.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.6.2.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.8.2.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.8 แทนเอนไซม์ เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

**3.8.3 การวัดปริมาณเซลลูเลสในกลุ่มเบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) โดยการวิเคราะห์หา β-glucosidase (Sternberg et al., 1976)**

3.8.3.1 นำเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.8.3.2 เติมสารละลาย salicin เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายในโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 ดังแสดงในภาคผนวก ค ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.8.3 นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

6.8.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6.8.5 เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 แทนเอนไซม์เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

**3.8.4 การวัดปริมาณโปรตีน (Gornall et al., 1949)**

นำเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย biuret ดังแสดงในภาคผนวก ค ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ดังแสดงในภาคผนวก ง โดยหลอดควบคุม (blank) ใช้น้ำกลั่น

### 3.9 การหมักและย่อยสลายแบบต่อเนื่อง (SSF)

#### 3.9.1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อทราบผลการทดลองในข้อ 3.7 แล้ว จึงเลือกว่าเยื่อเซลลูโลสละเอียดจากวัชพืชชนิดใดเป็นแหล่งของคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูเลสโดยเชื้อรา *T. reesei* Rut C-30 คือมีแอคติวิตีของเซลลูเลสทั้ง 3 กลุ่มดี เหมาะที่จะใช้ในกระบวนการ SSF จึงผลิตเซลลูเลสโดยใช้เยื่อเซลลูโลสละเอียดจากวัชพืชจำนวน 2 ชนิด เป็นแหล่งของคาร์บอน ในอาหารสูตร Production ซึ่งผลิตภายใต้สภาวะเดียวกันกับที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.7 แล้วทำการวัดค่าแอคติวิตีของเอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) (Ghose, 1987) เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) (Ghose, 1987) เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) (Sternberg et al., 1976) และปริมาณโปรตีน (Gornall et al., 1949)

#### 3.9.2 การปรับสภาพพืช

ทำการปรับสภาพพืชด้วยวิธีทางกายภาพและทางเคมี การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพทำได้โดยนำตัวอย่างพืชแต่ละชนิดมาตัดเป็นชิ้นๆ ขนาดยาวประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปบดด้วยเครื่องพอลิเมอร์ ขนาดตะแกรงบด 1.0 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีตามวิธีของ Punnapayak และ Hoffmann (1994) โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%(w/v) ในอัตราส่วน 2 : 1 (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ : ตัวอย่างพืช) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านจนกระทั่งมีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 จึงเก็บตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วโดยแช่ในสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.04 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 แล้วแช่ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน ก่อนที่นำไปจะใช้ในการหมัก

#### 3.9.3 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัย คือ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ซึ่งได้รับจาก Prof. Dr. Rodney J. Bothast (USDA) โดยเขี่ยเชื้อจำนวน 2 loop เต็ม ถ่ายลงในอาหารสูตร YMB ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เมื่อยีสต์เจริญจนเข้าสู่ภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด คือ 12 ชั่วโมง (สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา, 2546)
ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารสูตรเดิม แต่ขยายขนาดการผลิตเป็นระดับฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร โดยใช้เชื้อ

ปริมาตร 5%(v/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 125 รอบต่อนาที เมื่อยีสต์เจริญจนเข้าสู่ภาวะที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที (3521.7 g, r =12.6 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาแต่เซลล์ ล้างโดยการปั่นเหวี่ยง 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.04 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 หรือ normal saline เข้มข้น 0.85%(w/v) เมื่อได้เซลล์ยีสต์แล้ว ให้นำมาเจือจางด้วยอาหารสูตร Production จากนั้นนับจำนวนเซลล์ยีสต์ (ภาคผนวก จ) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการหมัก คือ $10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา, 2546)

### 3.9.4 การหมักแบบ SSF ในระดับฟลาสก์

ชั่งวัชพืชแต่ละชนิดที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว 3 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.04 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม F2 medium (Punnapayak, Kuhirun and Thanonkeo, 1999) ดังแสดงในภาคผนวก ข ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้ว นำมาเติมเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาตร 75 มิลลิลิตร และเติมยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ที่ความเข้มข้น $10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยอะลูมินัมฟอยล์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมัก คือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน (สุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา, 2546) จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที (3521.7 g, r =12.6 cm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง gas liquid chromatography (GC) โดยใช้ Porapak Q column แบบ ionization detector แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเอทานอล ดังแสดงในภาคผนวก ง

### 3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (นัยสำคัญเท่ากับ 0.05) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 10.0 ดังแสดงในภาคผนวก ฉ