

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การปรับปริมาณของแข็งละลาย

ในการปรับปริมาณของแข็งละลายในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานต้นข้าวฟ่าง หวานด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือซัลฟิวริกนั้น จะใช้น้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณของแข็งที่ ละลายได้ทั้งหมด

เท่ากับ 80 องศาบริกซ์ ในการปรับค่าปริมาณของแข็งละลายจะการใช้การวิเคราะห์ด้วย Hand Refractometer โดยมีการคำนวณดังสมการ

$$\text{ปริมาณของน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวาน (กิโลกรัม)} = \frac{[\text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ} - \text{ปริมาณของแข็งละลายที่วัดได้}]}{100 - \text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ}} \times \text{ปริมาตรสารละลาย (ลิตร)}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานต้นข้าวฟ่างหวานมีปริมาณของแข็งละลายเริ่มต้น 10 องศาบริกซ์ ต้องการเตรียมให้ได้ปริมาณของแข็งละลายเป็น 20 องศาบริกซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ทำได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{จากสมการ หาปริมาณน้ำตาลทราย (กิโลกรัม)} \\ &= \frac{[20 \text{ องศาบริกซ์} - 10 \text{ องศาบริกซ์}]}{100 - 20 \text{ องศาบริกซ์}} \times 0.35 \text{ ลิตร} \\ &= 0.043 \text{ กิโลกรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องเติมน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานปริมาณ 0.043 กิโลกรัม ลงไปในสารละลายน้ำตาลที่ได้ จากการย่อยชานต้นข้าวฟ่างหวานปริมาตร 350 มิลลิลิตร เพื่อปรับความหวานให้เป็น 20 องศาบริกซ์

ภาคผนวก 2

การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหาร ระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่มี การเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งเข้าสู่ exponential หรือ log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase เขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

เมื่อ x = ปริมาณเซลล์ มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร
 t = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง
 เมื่อ integrate สมการ (1) จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

เมื่อ x_0 = ปริมาณเซลล์เริ่มต้น
 x_t = ปริมาณเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง
 e = ฐานของ natural logarithm
 เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของจำนวนเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

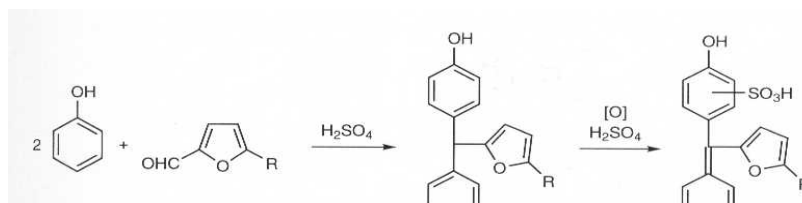
ภาคผนวก 3

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1 – 100 ไมโครกรัมกลูโคส และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

3.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

น้ำตาล mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharides ทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และน้ำตาล polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสียไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)



รูปที่ ผ. 1 ปฏิกริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triarylmethane dyes (Scherz and Bonn, 1998)

3.2 สารเคมี

- สารละลายฟีนอล 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 5.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

3.3 วิธีการวิเคราะห์

- 1) ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
- 2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน
- 3) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
- 4) นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard curve)



รูปที่ ผ. 2 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ใช้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของสารละลาย

3.4 ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

- 1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยการพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนกันทุกครั้ง ซึ่งต้องไปปรับวิธีการตามความเหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำและควรมีการทำชุดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

- 2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วคายความร้อน จะมีอุณหภูมิสูง และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำ การทดลองด้วยความระมัดระวัง

3.5 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD}_{490}) \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{การเจือจาง}}$$

โดยที่ความชัน = ค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ภาคผนวก 4

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5 – 500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

4.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสารตัวนี้จะ เปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500 – 550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



รูปที่ ผ. 3 ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5-dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid (Scherz and Bonn, 1998).

4.2 สารเคมี

- 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)
- DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม Sodium potassium tartrate (Rochelle salt) ลงไป 75 กรัม และคนจนกระทั่ง สารละลายหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายสัปดาห์

4.3 วิธีวิเคราะห์

- 1) ดูตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น
- 2) เติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที
- 4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง
- 5) เติมน้ำให้ครบ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 6) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

4.4 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์และแนวทางแก้ไข

- 1) ได้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แน่นอนในการวัดแต่ละครั้ง อาจเกิดจากความร้อนที่ทำให้ไม่สม่ำเสมอ แก้ไขโดยการให้เวลามากเกินพอจุดสมดุล และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้น ควรทำชุดน้ำตาลความเข้มข้นมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง
- 2) ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Mn, Co และ Ca จะเพิ่มปฏิกิริยาในการวิเคราะห์นี้ได้
- 3) วิธีนี้ไม่เหมาะกับสารตัวอย่างที่มีความเป็นกรดมาก

ภาคผนวก 5

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธี Microscopic count

Haemocytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแต่ได้นำมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของเรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้ มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ ผ. 4) ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 ($0.05 \times 0.05 \times 0.1$) ลูกบาศก์มิลลิเมตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตร ภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนา จะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

5.1 ข้อกำหนดของความถูกต้องแม่นยำ

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องใหญ่ (16 ช่องเล็กภายใน) ได้ในระหว่าง 10 - 50 เซลล์ ทำการนับในช่องใหญ่นี้เป็นจำนวน 5 ช่อง (บริเวณหัวมุม 4 ช่อง และตรงกลาง 1 ช่อง) แล้วนำค่ามาเฉลี่ย

5.2 การตรวจนับ

- 1) ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง
- 2) ปิดทับบริเวณสี่เหลี่ยม ซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์
- 3) ใช้ปิเปตและลูกยางดูดตัวอย่าง ตะล่อยปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น
- 4) ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า
- 5) นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนเซลล์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 - 50 เซลล์

5.3 การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับจากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 - 50 เซลล์)

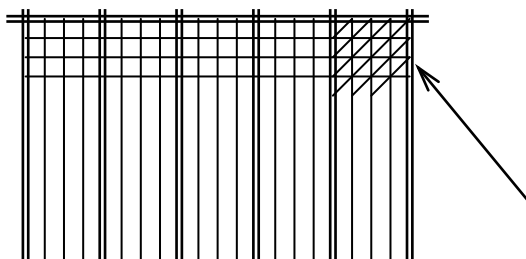
คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิเมตร ได้ดังนี้

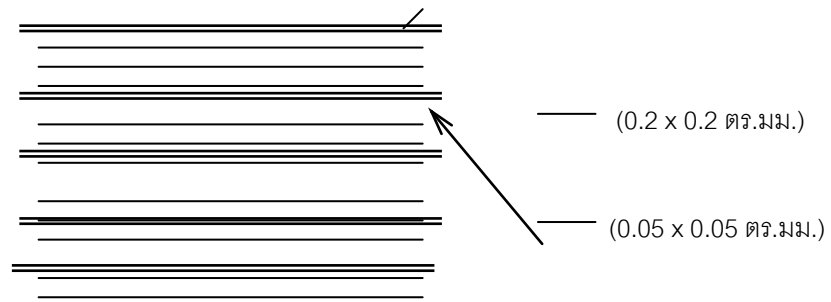
การตรวจนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ตัวอย่าง ที่ปริมาตร $\frac{1}{5}$ มิลลิเมตร(กว้าง) $\times \frac{1}{5}$ มิลลิเมตร(ยาว) $\times \frac{1}{10}$ มิลลิเมตร(สูง) $\times 5$ (ช่อง)

ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

= $X \times 5 \times (10^4) \times \text{dilution factor}$ (ค่าที่เจือจางเชื้อ) เซลล์ต่อมิลลิเมตร





รูปที่ ผ. 4 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ (บริเวณแรงเงาเป็นบริเวณ 1 ช่องใหญ่ ที่มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ภาคผนวก 6

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography method)

6.1 หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นมักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่นๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล้องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สนำพาตั้งไว้ที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (microsyringe) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูก

แยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่เครื่องตรวจจับ จากนั้นเครื่องตรวจจับจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

เนื่องจากการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำ และพื้นที่ใต้พีคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรที่ฉีดเข้าไปด้วย ดังนั้น จึงมักมีการผสมสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปในตัวอย่างด้วย เมื่อสารมาตรฐานที่เติมลงไปมีความเข้มข้นคงที่และเท่ากันทุกตัวอย่าง ดังนั้นการหาความเข้มข้นของเอทานอลจะใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเอทานอล และสารละลายมาตรฐาน ด้วยวิธีการนี้การวิเคราะห์จึงไม่ขึ้นกับปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป



รูปที่ ผ. 5 เครื่อง Gas chromatography ในการวิเคราะห์หาเอทานอล

6.2 วิธีการ

- 1) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 rpm เก็บส่วนใส (supernatant) ไว้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล
- 2) นำส่วนใสของสารตัวอย่างที่ได้มา 500 ไมโครลิตร เติม n-propanol ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปด้วยปริมาตรที่แน่นอน 500 ไมโครลิตร
- 3) ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี
- 4) หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไปแล้วประมาณ 15 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) ก็จะแสดงพีคของเอทานอล ออกมาก่อนตามด้วยพีคของ n-propanol โดยเวลาชะ (retention time) ของเอทานอลและ n-propanol มีค่า 5.54 และ 10.72 นาที ตามลำดับ เครื่องอินทิเกรเตอร์จะทำการคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้ยอดเอทานอลต่อ n-propanol แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
- 5) ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเอทานอล
- 6) ก่อนจะฉีดตัวอย่างต่อไปควรรอประมาณ 15 นาที หลังจากพีคที่สองออกมาแล้ว เพื่อเป็นการไล่สารที่อาจตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด

ภาคผนวก 7

การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากร้อยละโดยปริมาตร (% v/v) เป็นร้อยละโดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร (g/l)

$$\begin{aligned} & \text{สมมติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ได้ } X\% \text{ (โดยปริมาตร)} \\ & \text{นั่นคือสารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์} = X \text{ มิลลิลิตร} \\ & \text{ถ้าสารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์} = \frac{X \times 1,000}{100} \\ & = X \times 10 \text{ มิลลิลิตรต่อลิตร} \\ & \text{จากความหนาแน่นของเอทานอล} = 0.79 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร} \\ & \text{เพราะฉะนั้น ปริมาณแอลกอฮอล์} = X \times 10 \text{ มิลลิลิตรต่อลิตร} \times 0.79 \text{ กรัมต่อมิลลิลิตร} \\ & = X \times 10 \times 0.79 \text{ กรัมต่อลิตร} \end{aligned}$$

ภาคผนวก 8

การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (yield efficiency)

$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{\text{ผลได้เอทานอล}}{\text{ผลได้เอทานอลทางทฤษฎี (0.51)}} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ

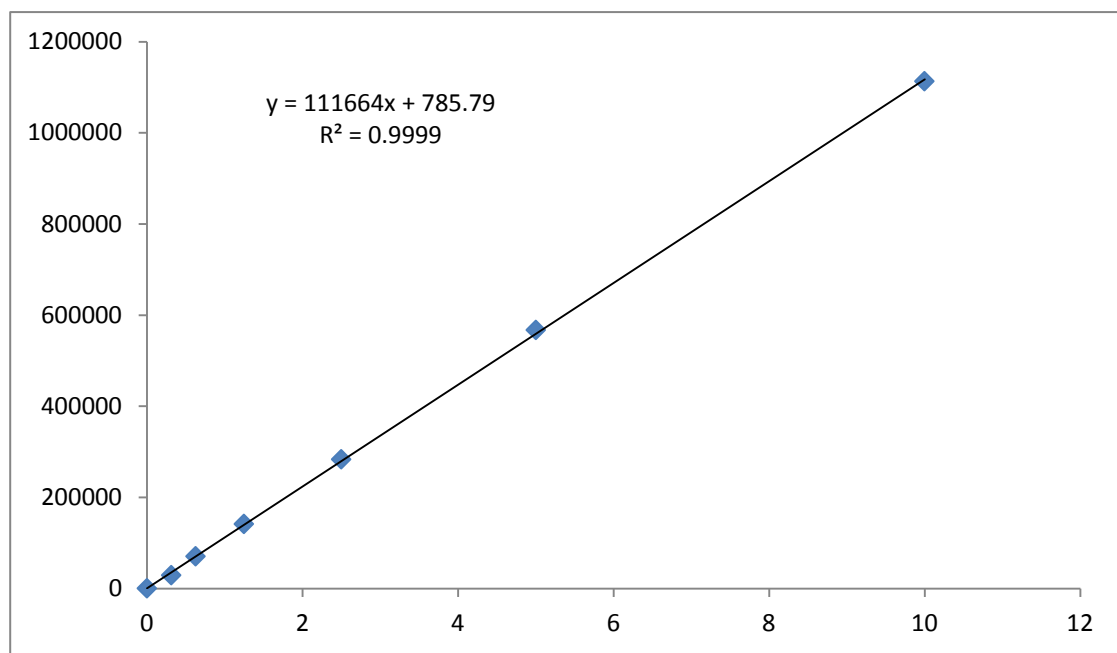
จากการหมักเอทานอลแบบกะโดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานต้นข้าวฟ่าง หวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้นหลังการปรับค่าความหวานด้วยน้ำเชื่อมเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ มีการตั้ง น้ำหมักจากตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นเอทานอลได้ 0.30 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปถึง ชั่วโมงที่ 48 ทำการตั้งน้ำหมักและวัดความเข้มข้นเอทานอลได้ 32.71 กรัมต่อลิตร ดังนั้นได้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้น $32.71 - 0.30$ เท่ากับ 32.41 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดที่ใช้คือ 111.55 กรัมต่อลิตร หาผลได้จากผลหารของเอทานอลที่ผลิตต่อน้ำตาล ทั้งหมดที่ใช้คือ $32.41/111.55$ เท่ากับ 0.29 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ จากผลได้ ทางทฤษฎีเท่ากับ 0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด แทนค่าในสูตรได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} &= \frac{0.29}{0.51} \times 100 \\ &= 56.86 \end{aligned}$$

ภาคผนวก 9
กราฟมาตรฐาน

9.1 กราฟมาตรฐาน glucose

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	Area (mV)
0	0
0.3125	29079.5
0.625	70567.5
1.25	141487.5
2.5	283104.5
5	566787
10	1112867.5



ประวัติและผลงานวิจัยของหัวหน้าโครงการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

- 1) ชื่อ (ไทย) นายพรเทพ ถนอมแก้ว
(อังกฤษ) Mr. Pornthap Thanonkeo
- 2) รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี)
39 – 40 – 0178
- 3) ตำแหน่งปัจจุบัน
รองศาสตราจารย์ ระดับ 9
- 4) หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัด
ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์/โทรสาร 0-4336-2121
- 5) ประวัติการศึกษา

ปีที่สำเร็จการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อย่อปริญญา	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2534	ปริญญาตรี	วท.บ.	พืชศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล	ไทย
2538	ปริญญาโท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2543	ปริญญาเอก	Ph.D.	Molecular Biology	Ehime University	ญี่ปุ่น

- 6) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)
เทคโนโลยีชีวภาพของพืช (Plant Biotechnology)
เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation Technology)
เทคโนโลยีของเอนไซม์ (Enzyme Technology)
- 7) ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่
 1. Piyachat Wiriyaampaiwong, Sudarat Thanonkeo, and Pornthap Thanonkeo. 2012. Cloning and characterization of chalcone synthase gene from *Pueraria candollei* var. *mirifica*. Journal of Medicinal Plants Research. 6(42):5469-5479. (3 November, 2012)
 2. Piyachat Wiriyaampaiwong, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo**. 2012. Molecular characterization of isoflavone synthase gene from *Pueraria candollei* var. *mirifica*. African Journal of Agricultural Research. 7(32): 4489-4498. (21 August, 2012)

3. Wuttisak Kunu, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo**. 2012. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) in *Ascocenda* spp. African Journal of Biotechnology. 11(34): 12702-12709. (9 August, 2012)
4. Dung Ngo Thi Phuong, **Pornthap Thanonkeo** and Huynh Xuan Phong. 2012. Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature. International Journal of Applied Science and Technology. 2(4): 65-71. (4 April, 2012)
5. Nuttaporn Chamnipa, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo***. 2012. Enhance production of 20-hydroxyecdysone in cell suspension cultures of *Vitex glabrata* R.Br. by elicitor feeding. Journal of Medicinal Plant Research. 6(17): 3317-3323. (Impact Factor: 0.879) (9 May, 2012)
6. Wuttisak Kunu, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo***. 2012. Cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) in orchid, *Ascocenda* spp. KKU Science Journal. 40 (supplement): 150-157.
7. Tritaporn Chantet, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo***. 2012. Enhancing protein content in soybean meal by mixed culture fermentation process. KKU Science Journal. 40 (supplement): 138-143.
8. **Pornthap Thanonkeo***, Sudarat Thanonkeo, Kannikar Charoensuk, and Mamoru Yamada. 2011. Ethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by *Zymomonas mobilis* TISTR548. African Journal of Biotechnology. 10: 10691-10697. (12 September, 2011)
9. Sudarat Thanonkeo, Nuttaporn Chamnipa and **Pornthap Thanonkeo***. 2011. Induced accumulation of 20-hydroxyecdysone in cell suspension cultures of *Vitex glabrata* R.Br. African Journal of Biotechnology. 10: 10612-10617. (12 September, 2011).
10. Noppon Lertwattanasakul, Nudchanok Rodrussamee, Suprayogi, Savitree Limtong, **Pornthap Thanonkeo***, Tomoyuki Kosada and Mamoru Yamada. 2011. Utilization capability of sucrose, raffinose and inulin and its less-sensitiveness to glucose repression in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. AMB Express. 1: 20.
11. Kannikar Charoensuk, Akira Irie, Noppon Lertwattanasakul, Keawta Sootsuwan, **Pornthap Thanonkeo*** and Mamoru Yamada. 2011. Physiological important of cytochrome c peroxidase in ethanologenic thermotolerant *Zymomonas mobilis*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 20: 70-82. (22 March, 2011).
12. Wipavadee Daiponmak, Piyada Theerakulpisut, **Pornthap Thanonkeo**, Apichart Vanavichit, Preecha Prathepha. 2010. Changes of anthocyanin cyaniding-3-glucoside content and antioxidant activity in Thai rice varieties under salinity stress. ScienceAsia. 36: 286-291.

13. **Pornthap Thanonkeo***, Rattanagon Monkeang, Weerasak Saksirirat, Sudarat Thanonkeo, and Koichi Akiyama. 2010. Cloning and molecular characterization of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene from thermotolerant mushroom, *Lentinus polychrous*. African Journal of Biotechnology. 9(22) May: 3242-3251. (***corresponding author**)
14. Titiporn Nagtong, Sudarat Thanonkeo, Preekamol Klanrit and **Pornthap Thanonkeo**. 2010. Cloning and differential expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene in different floral tissues of *Dendrobium* 'Anna' flowers. African Journal of Biotechnology. 9(15) April: 2256-2266. (***corresponding author**)
15. Summart, J., **Thanonkeo, P***, Panichajakul, S., Prathepha, P. and McManus, M.T. 2010. Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. African Journal of Biotechnology. 9 (2) January: 145-151. (***corresponding author**)
16. Noppon Lertwattanasakul, Emi Shigemoto, Nadchanok Rodrussame, Savitree Limtong, **Pornthap Thanonkeo** and Mamoru Yamada. 2009. The crucial role of alcohol dehydrogenase Adh3 in *Kluyveromyces marxianus* mitochondrial metabolism. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73(12): 2720-2726.
17. Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo***. 2009. The effect of N-Lauroylethanolamine on senescence of cut orchid flowers. World Applied Sciences Journal. 7(3):388-392. (***corresponding author**)
18. Titiporn Nagtong, Sudarat Thanonkeo, Preekamol Klanrit and **Pornthap Thanonkeo***. 2009. Cloning and characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene from orchid (*Dendrobium* spp.). World Applied Science Journal. 7(1):11-18. (***corresponding author**)
19. Suwita Saepisan, Weerasak Saksirirat, and **Pornthap Thanonkeo**. 2009. Efficiency of *Trichoderma* spp. to control Fusarium wilt of tomato. Journal of Thai Phytopathology. 23(1): 13-22.
20. P. Kaewkannetra, **P. Thanonkeo**, V. Tanamool and T. Imai (2008) Biorefinery of squeeze sweet sorghum juice into value added product of biopolymer, Journal of Biotechnology, 136: S412. (Impact factor 2.565)
21. Jaruwan Summart, Sanha Panichajakul, Preecha Prathepha and **Pornthap Thanonkeo***. 2008. Callus Induction and influence of culture condition and culture medium on growth of Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, cell culture. World Applied Sciences Journal. 5(2):246-251.
22. Mamoru Yamada, Kannikar Charoensuk, Akira Irie, Kaewta Sootsuwan and **Pornthap Thanonkeo**. 2008. Bio-ethanol production using thermotolerant ethanol-producing bacteria. Chemical Engineering. 53(9): 25-30.

23. Kanlayani Charoensopharat, Nuntipa Aukkanit, Sudarat Thanonkeo, Weerasak Saksirirat, **Pornthap Thanonkeo*** and Kouichi Akiyama. 2008. Target disruption of a G protein α subunit gene results in reduced growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 345-351. (***corresponding author**)
24. Kaewta Sootsuwan, Noppon Lertwattanasakul, **Pornthap Thanonkeo**, Kazunobu Matsushita and Mamoru Yamada. 2008. Analysis of the respiratory chain in ethanologenic *Zymomonas mobilis* with a cyanide-resistant bd-type ubiquinol oxidase as the only terminal oxidase and its possible physiological roles. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 14: 163-175.
25. Pakvirun Thuesombat, **Pornthap Thanonkeo**, Lakkana Laopaiboon, Pattana Laopaiboon, Sirinda Yunchalard, Pakawadee Kaewkannetra and Sudarat Thanonkeo. 2007. The batch ethanol fermentation of Jerusalem artichoke using *Saccharomyces cerevisiae*. KMITL Sci. Tech. J. 7(S2): 93-96. (***corresponding author**)
26. Tatcha Onsoy, **Pornthap Thanonkeo***, Sudarat Thanonkeo and Mamoru Yamada. 2007. Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. KMITL Sci. Tech. J. 7(S1): 55-60. (***corresponding author**)
27. Kaewta Sootsuwan, Akira Irie, Masayuki Murata, Noppon Lertwattanasakul, **Pornthap Thanonkeo** and Mamoru Yamada. 2007. Thermotolerant *Zymomonas mobilis*: Comparison of ethanol fermentation capability with that of an efficient type strain. The Open Biotechnology Journal. 1: 52-58.
28. Lakkana Laopaiboon, **Pornthap Thanonkeo**, Prasit Jaisil and Pattana Laopaiboon. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 1497-1501.
29. Noppon Lertwattanasakul, Kaewta Sootsuwan, Savitree Limthong, **Pornthap Thanonkeo** and Mamoru Yamada. 2007. Comparison of the gene expression patterns of alcohol dehydrogenase isozymes in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and their physiological functions. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 71(5): 1170-1182.
30. **Pornthap Thanonkeo***, Kaewta Sootsuwan, Vichai Leelavacharamas and Mamoru Yamada. 2007. Cloning and transcriptional analysis of the *groES* and *groEL* from ethanol producing bacterium, *Zymomonas mobilis* TISTR548. Pakistan Journal of Biological Science. 10(1): 13-22. (***corresponding author**)
31. **Pornthap Thanonkeo***, Kaewta Sootsuwan, Pattana Laopaiboon and Mamoru Yamada. 2007. Magnesium ions improve growth and ethanol production of

Zymomonas mobilis under heat or ethanol stress. Biotechnology. 6(1):112-119.

(*corresponding author)

32. Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo**. 2007. Tissue culture of *Rhynchosyris gigantea* (Lindl.) Ridl. Journal of Science and Technology, Mahasarakham University. Special Issue: 328-334.
33. Waratsanee Siriyotha, Pattana Laopaiboon, Sudarat Thanonkeo and **Pornthap Thanonkeo**. 2007. Ethanol production from sweet sorghum juice by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using batch and repeated batch culture. Naresuan Agriculture Journal. 10(2): 241-251.
34. Chaichalerm Jongsomchai, **Pornthap Thanonkeo**, Prasit Jaisil, Pattana Laopaiboon and Vichai Leelavatcharamas. 2007. Ethanol production from sweet sorghum stem juice by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. Naresuan Agriculture Journal. 10(1): 321-327.
35. **Pornthap Thanonkeo*** and Sudarat Thanonkeo. 2007. Cultural optimization for dextranase production from an isolated *Aspergillus* sp. Chiangmai University Journal of Agro-Industry. 1: 1-12. (*corresponding author)
36. Waratsanee Siriyotha, Pattana Laopaiboon, Kanit Vichitphun and **Pornthap Thanonkeo***. 2006. Molecular cloning of the gene encoding malolactic enzyme from *Lactococcus lactis* IO-1. Thai Journal of Biotechnology. 7(2): 12-19. (*corresponding author)
37. **Pornthap Thanonkeo***, Kanit Vichitphan and Pattana Laopaiboon. 2006. Some fermentation parameters influencing single cell protein production from cassava starch by *Schwanniomyces occidentalis* TISTR. Khon Kaen Agriculture Journal. 34 (3): 164-172. (*corresponding author)
38. Rattanawadi Yothalak, **Pornthap Thanonkeo*** and Weerasak Saksirirat. 2006. The cold-shock response in *Volvariella volvacea*. KMITL Science Journal : An International Journal of Science and Applied Science. 6: 713-723. (*corresponding author)
39. Suwita Saepisan, Weerasak Saksirirat and **Pornthap Thanonkeo**. 2006. Chitinase gene cloning from effective isolates of *Trichoderma* spp. against tomato wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*). Agricultural Sci. J. 37(6) (Suppl.):1021-1024.
40. Manatsawee Chayphad, Weerasak Saksirirat, and **Pornthap Thanonkeo**. 2005. Development of molecular biology method for race identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, a causal agent of Fusarium wilt of tomato. Khon Kaen Agriculture Journal. 33(2):108-123.
41. Nipat Srirakul, Lakkana Laopaiboon, **Pornthap Thanonkeo**, Pattana Laopaiboon and Paiboon Danvirutai. 2005. Preliminary study of continuous fermentation for

- kaew mango wine production in a packed bed bioreactor with immobilized yeasts. *KKU Res. J. (GS)*. 5:30-35.
42. **Thanonkeo, P.**, Akiyama, K., Jain, S., and Takata, R. 2000. Targeted disruption of *sti35*, a stress-responsive gene in phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Current Microbiology*. 41(4): 284-289.
 43. Akiyama, K., **Thanonkeo, P.**, Ogawa, H., Ohguchi, T., and Takata, R. 2000. Detection and gene cloning of a protein induced in nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum*. *J. Bioscience and Bioengineering*. 90 (3): 302-307.
 44. Punnapayak, H., Kuhirun, M., and **Thanonkeo, P.** 1999. Cellulolytic fungi and the bioconversion of fiber from *Agave sisalana*. *ScienceAsia*. 25:133-136.
 45. **Pornthap Thanonkeo**. 2000. Cloning, Expression and Disruption of a Stress-responsive Gene, *sti35*, in Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. Doctoral Thesis. Ehime University, Ehime, Japan.
 46. **Pornthap Thanonkeo**. 1995. Optimal conditions of cellulase production from fungi isolated from *Agave sisalana* Perrine plantations. Master thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
 47. **Pornthap Thanonkeo**, Kanit Vichitphun, Patana Laopaiboon and Vikul Rittirm. 1998. Research on single cell protein development for feed production. Research report submitted to National Research Council of Thailand and Khon Kaen University. Thailand.