บรรณานุกรม

1. น้อม ขันติคุณ. 2523. ข้าวฟ่างหวานในรูปของวัตถุดิบเพื่อใช้ผลิตน้ำตาล. วารสารน้ำตาล. 16, 11-16
2. วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร. 163 หน้า
3. ประสิทธิ์ ใจศิล. 2549. รายงานความก้าวหน้า เรื่อง การผลิตข้าวฟ่างหวานเพื่ออุตสาหกรรมผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์. ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
4. ประสิทธิ์ ใจศิล. 2551. การวิจัยและพัฒนาข้าวฟ่างหวานเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์. การสัมมนาเรื่อง ร่วมแก้วิกฤติพลังงานชาติ : ด้วยงานวิจัย วช. โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ร่วมกับธนาคารพัฒนาวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อมแห่งประเทศไทย วันที่ 30 เมษายน 2551 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร.
5. สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2554. สถานการณ์พลังงานปี 2554 และแนวโน้มปี 2555. วารสารนโยบายพลังงาน. 94: 12-20.
6. สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2552. ทางเลือก-ทางรอดพลังงานไทยในวิกฤตภาวะโลกร้อน. วารสารนโยบายพลังงาน. 84: 8-13.
7. สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2553. สถานการณ์พลังงานไทยในช่วง 3 เดือนแรกของปี 2553. 88: 18-34.
8. Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabanas, A., Carrasco, J., Martin, C., Negro, M., Saez, F., Saez, R., 1991. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. Appl Biochem Biotechnol. 28-29(1), 307-315
9. Banat, I. M., Nigam, P., Marchant, R., 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World J Microbiol Biotechnol. 8(3), 259-263.
10. D'Amore, T. 1992. Improving yeast fermentation performance. J Inst Brew. 98, 375-382
11. Dhaliwal, S.S., Oberoi, H.S., Sandhu, S.K., Nanda, D., Kumar, D., Uppal, S.K., 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii.* Bioresour Technol. 102, 5968–5975.

12. Faga, B.A., Wilkins, M.R., Banat, I.M., 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D_5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. Bioresour Technol. 101(7), 2273-2279
13. Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T., Chowdary, G. V., 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Bioresour Technol., 77(2), 193-196.
14. Ingledew, W.M. 1999. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. **In The Alcohol Textbook**. 3rd ed. Nottingham: Nottingham University Press.
15. Jasberg, B.k., Montgomery, R.R. and Anderson, R.A. 1983. Preservation of sweet sorghum biomass. Biotechnology Bioengineering Symposium. 13: 113-120.
16. Khongsay, N., Laopaiboon, L. and Laopaiboon, P. 2010. Growth and batch ethanol fermentation of Saccharomyces cerevisiae on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions. Biotechnol. 9: 9-16.
17. Kiran Sree, N., Sridhan, M., Suresh, K., Banat, I.M. and Venkateswar Rao, L. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating, *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresource Technology. 72: 43-46.
18. Kiran Sree, N., Sridhar, M., Venkateswar Rao, L. & Ashok, P. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeasts. Process Biochem. 34, 115–119.
19. Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W., 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus.* Bioresour Technol. 98(17), 3367-3374.
20. Liu, R. and Shen, F. 2008. Refining sweet sorghum from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. Renewable. Energy. 33: 1130-1135.
21. McCracken, L.D. and Gong, C.S. 1982. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeasts. Biotechnology and Bioengineering. 12: 91.
22. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2000. Nutrition and metabolism. **Brock Biology of Microbiology**. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall.

23. Singh, D., Nigam, P., Banat, I.M., Marchant, R, McHale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part II: Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. World J Microbiol Biotechnol. 14, 823-834.
24. Sprenger, G.A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol Lett., 145, 301–307.
25. Subramanian, V., Eswara Prasada Rao, K., Mengesha, M.H. and Jambunathan, R. 1987. Total sugar content in sorghum stalks and grains of selected cultivars from the world germplasm collection. J. Sci. Food Agric. 39: 289-295.
26. Thanonkeo, P., Laopaiboon, P. and Laopaiboon, P. 2002. Renewable Alternative Fuel from Sweet Sorghum. Proceeding of the International Symposium on Alcohol Fuels. Nov 12 – 15, 2002. Phuket, Thailand.
27. Thomas, K.C., Hynes, S.H., Jones, A.M., Ingledew, W.M. 1993. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology. Appl Biochem Biotechnol. 43, 211–226
28. Yu, J., Zhang, X., Tan,T., 2008. Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. Fuel Process Technol. 89, 1056–1059
29. Walker, G. M., 1994. The Roles of Magnesium in Biotechnology. Crit Rev Biotechnol. 14(4), 311-354.
30. Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons. New York.
31. Wilkins, M.R., Mueller, M., Eichling, S., Banat, I.M., 2008. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. Process Biochem. 43, 346–350

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การปรับปริมาณของแข็งละลาย

ในการปรับปริมาณของแข็งละลายในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน จะใช้น้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 80 องศาบริกซ์ ในการปรับค่าปริมาณของแข็งละลายจะใช้การวิเคราะห์ด้วย Hand Refractometer โดยมีการคำนวณดังสมการ

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

ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายน้ำตาลที่ได้จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานมีปริมาณของแข็งละลายเริ่มต้น 10 องศาบริกซ์ ต้องการเตรียมให้ได้ปริมาณของแข็งละลายเป็น 20 องศาบริกซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ทำได้ดังนี้

จากสมการ หาปริมาณน้ำตาลทราย (กิโลกรัม)

$$= \frac{[20 \text{ องศาบริกซ์} - 10 \text{ องศาบริกซ์}]}{100 - 20 \text{ องศาบริกซ์}} \times 0.35 \text{ ลิตร}$$

$$= 0.043 \text{ กิโลกรัม}$$

ดังนั้น ต้องเติมน้ำเชื่อมข้าวฟ่างหวานปริมาณ 0.043 กิโลกรัม ลงไปในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปริมาตร 350 มิลลิลิตร เพื่อปรับความหวานให้เป็น 20 องศาบริกซ์

ภาคผนวก 2

การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

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

$$dx/dt = \mu x \qquad (1)$$

เมื่อ x = ปริมาณเซลล์ มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร

t = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง

เมื่อ integrate สมการ (1) จะได้

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

เมื่อ x_0 = ปริมาณเซลล์เริ่มต้น

x_t = ปริมาณเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

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

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของจำนวนเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยง

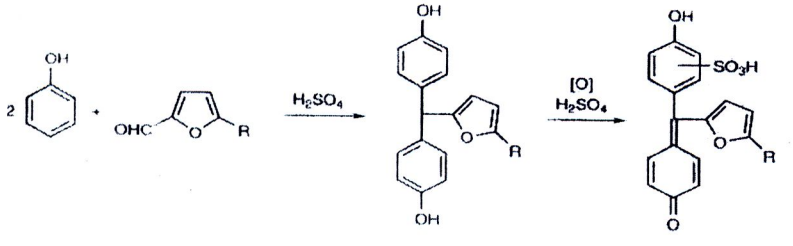
ภาคผนวก 3

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 ทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริคเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และน้ำตาล polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธุ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายไปเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)



รูปที่ ผ. 1 ปฏิกิริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟิวริคเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triarylmethane dyes (Scherz and Bonn, 1998)

3.2 สารเคมี

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

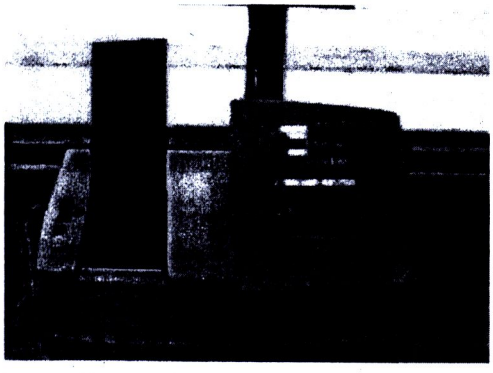
3.3 วิธีการวิเคราะห์

1) ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)

2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน

3) เติมกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

4) นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard curve)



ภาพที่ ผ.2 เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ใช้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของสารละลาย

3.4 ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยการพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนๆ กันทุกครั้ง 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)

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

ภาพที่ 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 และคนจนกระทั่งสารละลายหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายสัปดาห์

4.3 วิธีวิเคราะห์

1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลจำนวน 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 อาจเกิดจากความร้อนที่ให้ไม่สม่ำเสมอ แก้ไขโดยการให้เวลามากเกินพอจุดสมดุล และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้น ควรทำชุดน้ำตาลความเข้มข้นมาตราฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

2) ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Mn, Co และ Ca จะเพิ่มปฏิกิริยาในการวิเคราะห์นี้ได้

3) วิธีการนี้ไม่เหมาะกับสารตัวอย่างที่มีความเป็นกรดมาก

ภาคผนวก 5

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ โดยวิธี Microscopic count

Haemacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแต่ได้นำมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลินทรีย์และสปอร์ของรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร 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 (0.05×0.05×0.1) 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 แตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น
4) ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า
5) นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนเซลล์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 50 เซลล์

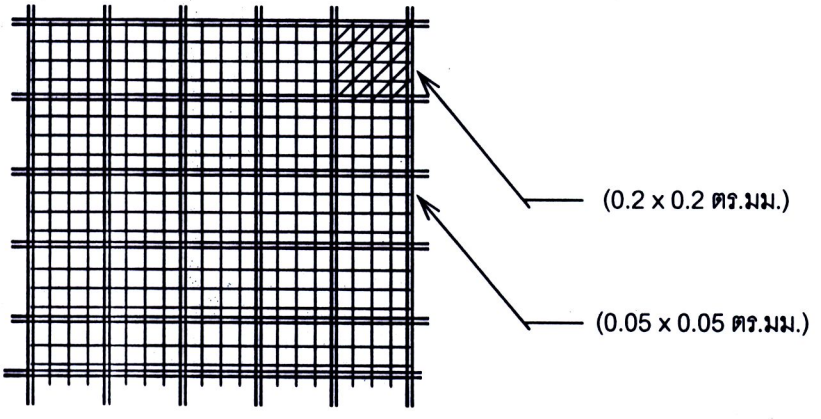
5.3 การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับจากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 – 50 เซลล์) คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้

การตรวจนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ตัวอย่าง ที่ปริมาตร 1/5 มิลลิเมตร(กว้าง) x 1/5 มิลลิเมตร (ยาว) x 1/10 มิลลิเมตร (สูง) x 5 (ช่อง) ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

= X x 5 x (10^4) x dilution factor (ค่าที่เจือจางเชื้อ) เซลล์ต่อมิลลิลิตร



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

ภาคผนวก 6

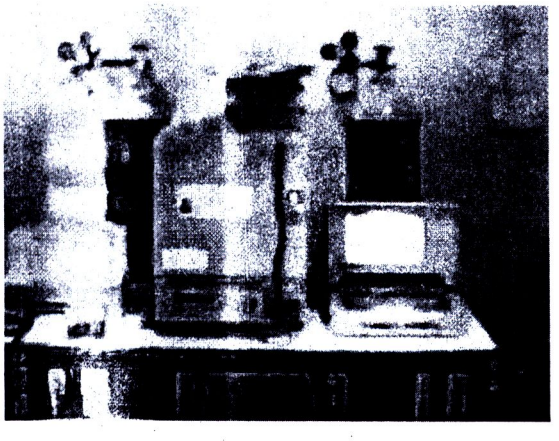
การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography method)

6.1 หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น มักจะวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่นๆ ได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของก๊าซนำพาตั้งไว้ที่ 30 มิลลิลิตรต่อนาที

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (microsyringe) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆ เมื่อไอระเหยออกจากคอลัมน์ก็จะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด จากนั้นเครื่องตรวจวัดจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

เนื่องจากเป็นการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาตรน้อยๆ 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 หลังจากที่พีคที่สองออกมาแล้ว เพื่อเป็นการไล่สารที่อาจตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด

ภาคผนวก 7

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

สมมติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ได้ X% (โดยปริมาตร)

นั่นคือสารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = X มิลลิลิตร

ถ้าสารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = $\frac{X \times 1,000}{100}$

= X x 10 มิลลิลิตรต่อลิตร

จากความหนาแน่นของเอทานอล = 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น ปริมาณแอลกอฮอล์ = X x 10 มิลลิลิตรต่อลิตร x 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร

= X x 10 x 0.79 กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก 8

การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (yield efficiency)

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

ตัวอย่างการคำนวณ

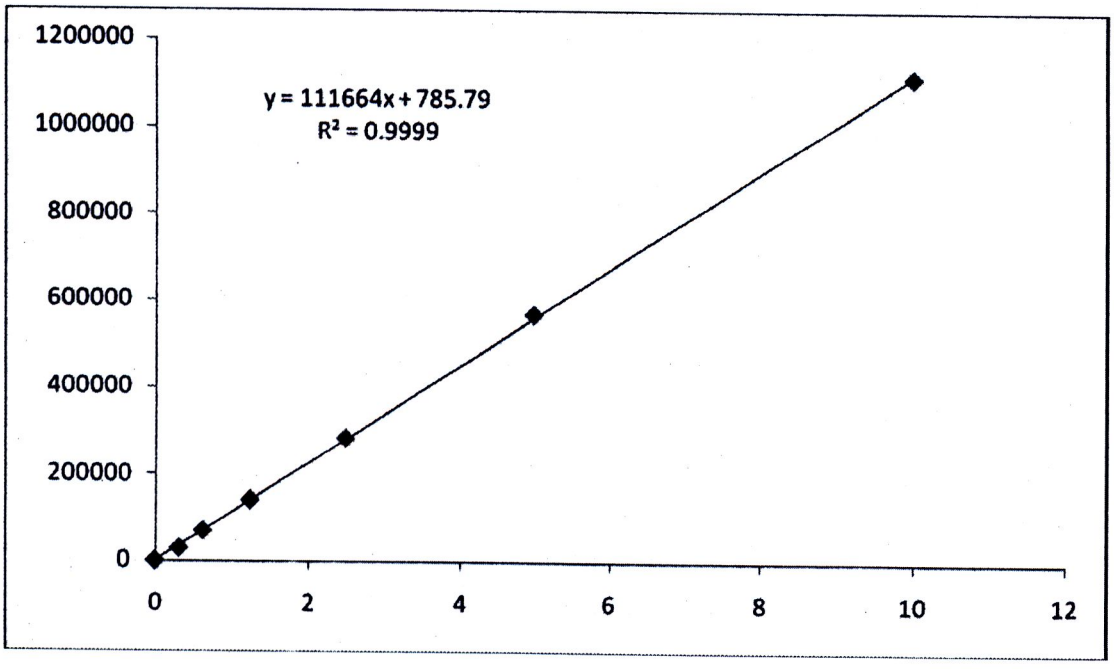
จากการหมักเอทานอลแบบกะโดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยชานต้นข้าวฟ่าง หวานที่มีน้ำตาลเริ่มต้นหลังการปรับค่าความหวานด้วยน้ำเชื่อมเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ มีการดึง น้ำหมักจากตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นเอทานอลได้ 0.30 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักดำเนินไปถึงชั่วโมงที่ 48 ทำการดึงน้ำหมักและวัดความเข้มข้นเอทานอลได้ 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

$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{0.29}{0.51} \times 100$$

$$= 56.86$$

ภาคผนวก 9

กราฟมาตรฐาน

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