

เอกสารอ้างอิง

- เอทานอลจากจุลินทรีย์. [ม.ป.ป.]. ค้นเมื่อ 3 กันยายน 2549 [จาก <http://www.nrel.gov>]
- พรเทพ ถนนแก้ว พัฒนา เหล่าไพบูลย์ ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และประสิทธิ์ ใจศิลป์. 2547. รายงานการวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดย *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ และกึ่งกะ. ขอนแก่น : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พรพจน์ นาราคาม เมธาวี ศิริสวัสดิ์ และวุฒิชัย ศรีภิญโญ. 2547. การผลิตเอทานอลจากเปลือกและแกนสับปะรดโดยการหมักแบบกะ. รายงานโครงการพิเศษทางวิศวกรรมเคมี. ขอนแก่น : คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มานิช โพธิ์สูง. 2546. การผลิตเอทานอลที่ได้จากน้ำเชื่อมที่ได้จากการปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*. วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. กรุงเทพฯ : สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ สิริโชค. 2547. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพฯ.
- สมพร อิศวิลานนท์ และกล้าณรงค์ ศรีรอด. 2546. การศึกษาวิจัยเพื่อกำหนดทิศทางการพัฒนาอุตสาหกรรมเอทานอลของประเทศไทย. รายงานการวิจัยเสนอสำนักงานคณะกรรมการเอทานอลแห่งชาติ กระทรวงอุตสาหกรรม. ค้นเมื่อ 3 กันยายน 2549 [จาก <http://www.ocs.or.th/News/effect.html>].
- สนั่น จอกลอย. 2549. แก่นตะวัน. ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. (จุลสาร).
- Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., and Scarmino, I.S. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*. 98 (15): 2824-2828.
- Duke, J.A. 1983. *Helianthus tuberosus* L. Handbook of Energy Crops. Retrieved June 20, 2006 [Available from http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Helianthus_tuberosus.html].
- Ge, X.Y., and Zhang, W.G. 2005. Production of ethanol from Jerusalem artichoke tubers. *Food Technology and Biotechnology*. 43(3): 241-246.
- Gunasekaran, P., Karunakaran, T., and Kasthuribai, M. 1986. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. *Journal of Biosciences*. 10(2): 181-186.
- Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2007. The diversity of metabolism in prokaryotes. Retrieved January 2, 2008. [Available from <http://www.textbookofbacteriology.net>].
- Khaewthonma, T., Ruanglek, V., Duandusittaphan, Y., Ishizaki, A., and Tripetchkul, S. 2001. Enhancement of ethanol production using pH – auxostat by *Zymomonas mobilis*. BioThailand. November 7-10, 2001, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.
- Kim, C.H., Abidin, Z., Ngee, C.C., and Rhee, S.K. 1992. Pilot-scale ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* from simultaneously saccharified sago starch. *Bioresource Technology*. 40(1): 1-6.

- Linqun, W., Jianhua, W., Xiaodong, Z., Da, T., Yalin, Y., Chenggang, C., Tianhua, F., and Fan, Z. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*. 79(3): 1087-1093.
- Magaritis, A., and Bajpai, P. 1982a. Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*. 45(2): 723-725.
- Magaritis, A., and Bajpai, P. 1982b. Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* growth on Jerusalem artichoke juice. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(6): 1325-1329.
- Mohagheghi, A., Ruth, M., and Schell, D.J. 2006. Conditioning hemicelluloses hydrolysates for fermentation: effects of over liming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*. 41(8): 1806-1811.
- Naib. 2007. The other ethanol-making ethanol from cellulose. Retrieved June 29, 2006. [Available from <http://www.blog.thesietch.org/html>].
- Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S., and Ohta, K. 1996. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 81(6): 564-566.
- Nowak, J. 2000. Ethanol yield and productivity of *Zymomonas mobilis* in various fermentation methods. Retrieved June 20, 2006. [Available from <http://www.ejpau.media.pl/volum3/issue2/food/art-04.html>].
- Ohta, K., Hamada, S., and Nakamura, T. 1992. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *A. niger* and *S. cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(3): 729-733.
- Paslk, R.A. 2001. Biochemical pathway diagrams. Retrieved January 2, 2008. [Available from <http://www.humboldt.edu/rap1/C431.F01/PathwayDiagrams/PathIndex>].
- Patle, S., and Lal, B. 2008. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*. 32(7): 596-602.
- Ponceta, S., Jacob, F.H., Berton, M.C., and Couble, A. 1985. Fermentation alcoolique de l'inuline par quelques souches de levures. *Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology*. 136:99-109.
- Rogers, P.L., Lee, K.L., Tribe, D.E. 1980. High productivity ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Procees Biochemistry*. 15: 7-11.
- Schorr-Galindo, S., Ghommidh, C., and Guiraud, J.P. 2000. Influence of yeast flocculation on the rate of Jerusalem artichoke extract fermentation. *Current Microbiology*. 41: 89-95.
- Swings, J. and De Ley, J. 1977. The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Review*. 1-46.
- Szambelan, K., Nowak, J. and Czarnecki, Z. 2004. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyvermyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem Artichoke Tubers, *Biotechnology Letters*, 26: 845-848
- Szambelan, K., Nowak, J., Chrapkowska, K.J. 2004. Comparison of bacterial and yeast ethanol fermentation yield from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers pulp and juices. *Acta Sci.Pol.Techol.Aliment*. 3: 45-53.
- Tao F., Miao J.Y., Shi G.Y., Zhang K.C. (2005). Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Bio chemistry*. 40: 183-187.

Zamora, A. 2005. Carbohydrates-Chemical Structure. Retrieved January 2, 2008. [Available from <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1>].

ภาคผนวก ก
การปรับปริมาณของแข็งละลาย

การปรับปริมาณของแข็งละลาย

ปรับปริมาณของแข็งละลายในน้ำหวานที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวันโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและใช้ Hand Refractometer วัดในหน่วยของศาบริกซ์ โดยมีการคำนวณดังสมการ

ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ใส่เดิม (กิโลกรัม)

$$= \frac{(\text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ} - \text{ปริมาณของแข็งละลายที่วัดได้}) \times \text{ปริมาตรสารละลาย}}{100 - \text{ปริมาณของแข็งละลายที่ต้องการ}} \quad (\text{ลิตร})$$

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำสกัดจากหัวแก่นตะวันมีปริมาณของแข็งละลายเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ ต้องการเตรียมให้ได้ปริมาณของแข็งละลายเป็น 21 องศาบริกซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ทำได้ดังนี้

จากสมการ หาปริมาณน้ำตาลทราย (กิโลกรัม)

$$\begin{aligned} &= \frac{(21 \text{ องศาบริกซ์} - 16 \text{ องศาบริกซ์})}{100 - 21 \text{ องศาบริกซ์}} \times 0.35 \text{ ลิตร} \\ &= 0.022 \text{ กิโลกรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องเติมน้ำตาลกลูโคส 0.022 กิโลกรัม ลงไปในน้ำหวานปริมาตร 350 มิลลิลิตร เพื่อปรับความหวานให้เป็น 21 องศาบริกซ์

ภาคผนวก ข
การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

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

$$dx / dt = \mu x \tag{1}$$

- เมื่อ
- x

t

μ

=

ปริมาณเซลล์ มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร
เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง
อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง
- เมื่อ integrate สมการ (1) จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \tag{2}$$

- เมื่อ
- x_0

x_t

e

=

ปริมาณเซลล์เริ่มต้น
ปริมาณเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง
ฐานของ natural logarithm
- เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \tag{3}$$

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

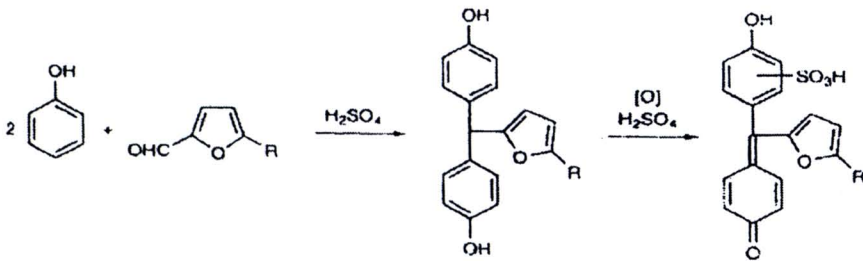
ภาคผนวก ค
การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol – sulfuric

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol – sulfuric

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

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 กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triaryl methane dyes)



รูปที่ ผ. 1 ปฏิกิริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต (ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triaryl methane dyes (Scherz and Bonn, 1998)

2 สารเคมี

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

3 วิธีการวิเคราะห์

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

4 ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยการพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือน ๆ กันทุกครั้ง ซึ่งต้องไปปรับวิธีการตามความเหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำและควรมีการทำชุดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วคายความร้อน จะมีอุณหภูมิสูง และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง

5 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง (OD₄₉₀) x $\frac{1}{\text{ความชัน}}$ x $\frac{1}{\text{การเจือจาง}}$

โดยที่ความชัน = ค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐาน
และการเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ภาคผนวก ง

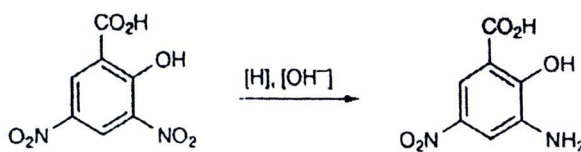
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5 – 500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การคัมน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายต่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสงช่วง 500 – 550 นาโนเมตร ปฏิกิริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



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

2 สารเคมี

- 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 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

3 วิธีวิเคราะห์

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

4 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์และแนวทางแก้ไข

1) ได้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แน่นอนในการวัดแต่ละครั้ง อาจเกิดจากความร้อนที่ทำให้ไม่สม่ำเสมอ แก้วไข โดยการให้เวลามากเกินไปพอจุดสมดุล และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้น ควรทำชุดน้ำตาความเข้มข้นมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

- 2) ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Mn, Co และ Ca จะเพิ่มปฏิกิริยาในการวิเคราะห์นี้ได้
- 3) วิธีการนี้ไม่เหมาะกับสารตัวอย่างที่มีความเป็นกรดมาก



ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณของอินูลิน (inulin) (Wei Lingyun, 2006)

การวิเคราะห์ปริมาณของอินูลิน (inulin) (Wei Lingyun, 2006)

1. วิธีวิเคราะห์

1) วัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด หรือน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธี Phenol – sulfuric โดยใช้อินูลิน เป็นสารมาตรฐาน

2) วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยใช้ D (-) – Fructose (MW = 180.16, Fluka) เป็นสารมาตรฐาน

2. การคำนวณปริมาณของอินูลิน

Inulin content

$$= \frac{\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด หรือน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์}}{\text{(Total Sugar)} \quad \text{(Reducing Sugar)}}$$

Inulin extraction yield (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{Inulin content} \times \text{volume of extraction liquid}}{\text{mass of artichoke powder}} \times 100$$

ภาคผนวก ก

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) ด้วยวิธีการ Spread plate

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable cell count) ด้วยวิธีการ Spread plate เป็นวิธีการนับเซลล์ที่มีชีวิตที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง

1. หลักการ

เซลล์จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable cell) เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งจะสามารถเจริญแบ่งเซลล์ จนมองเห็นได้เป็นรูปโคโลนี (Visible colony form)

การนับจำนวนเซลล์จะนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น (Colony forming unit, Cfu) ที่ปริมาตรหนึ่งปริมาตร โดยของ liquid culture โดยที่ปกติเซลล์ที่อยู่ในช่วง Exponential Growth Phase หรือเซลล์ที่อยู่ในช่วง Early Stationary phase จะสามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ ดังนั้นการนับจำนวนโคโลนีจึงสามารถบอกได้ใกล้เคียงกับจำนวนของ viable cells ข้อที่สำคัญคือ โคโลนีที่เกิดขึ้นนั้นควรมาจาก 1 เซลล์เท่านั้น

2. วิธีการ

- 1) เตรียม Diluent ที่เหมาะสม เช่น normal saline (0.85 % w/v in H₂O)
- 2) เช็ดบริเวณโต๊ะที่จะทำการ spread plate ให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 %
- 3) เจือจางตัวอย่างด้วย diluent ปลอดเชื้อ ให้มีความเจือจางที่ต้องการ (สมมติเป็น 100 เท่า)

ด้วยวิธี serial dilution ดังนี้

3.1) ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน diluent ปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1)

เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer หลอดนี้จะมีค่าความเจือจาง 1:10

3.2) ใช้ปิเปตอันใหม่ดูดตัวอย่างจากหลอดที่ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน diluent ปลอดเชื้อ

9 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2) เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer หลอดนี้จะมีค่าความเจือจาง 1:100

3.3) ทำเช่นนี้จนได้ความเจือจางที่ต้องการ

4) ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง (YPA agar)

5) นำแท่งแก้วจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านไฟ ปล่อยให้เย็น (ราว 10-15 วินาที) เกลี่ยทาเชื้อให้กระจาย

ทั่วผิวหน้าอาหาร

6) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยคว่ำจานลง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7) นับจำนวนโคโลนีต่อจานเชื้อในระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณกลับเป็นจำนวนของ

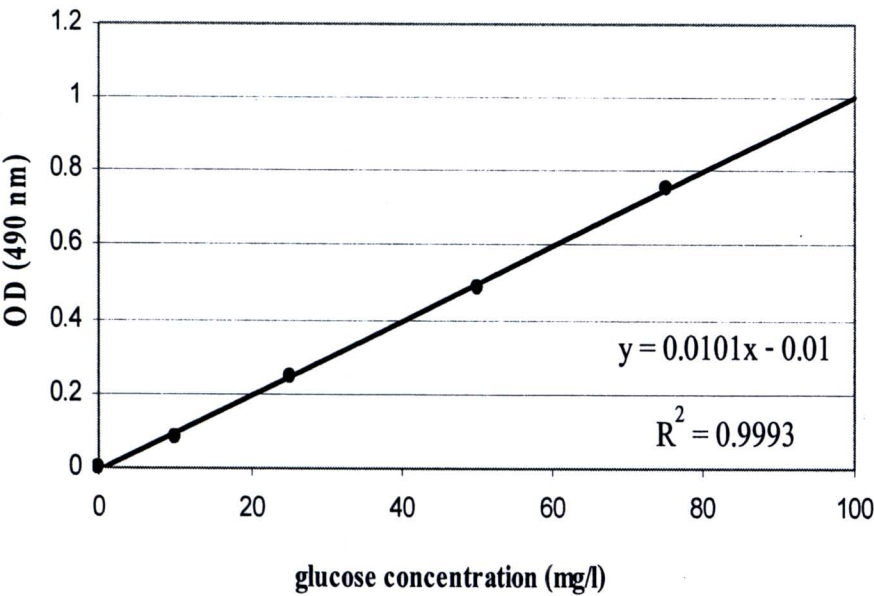
จุลินทรีย์ต่อ 1.0 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : หากตัวอย่างที่ต้องการแยกมีจำนวนจุลินทรีย์ต่ำ ไม่จำเป็นต้องทำ serial dilution

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

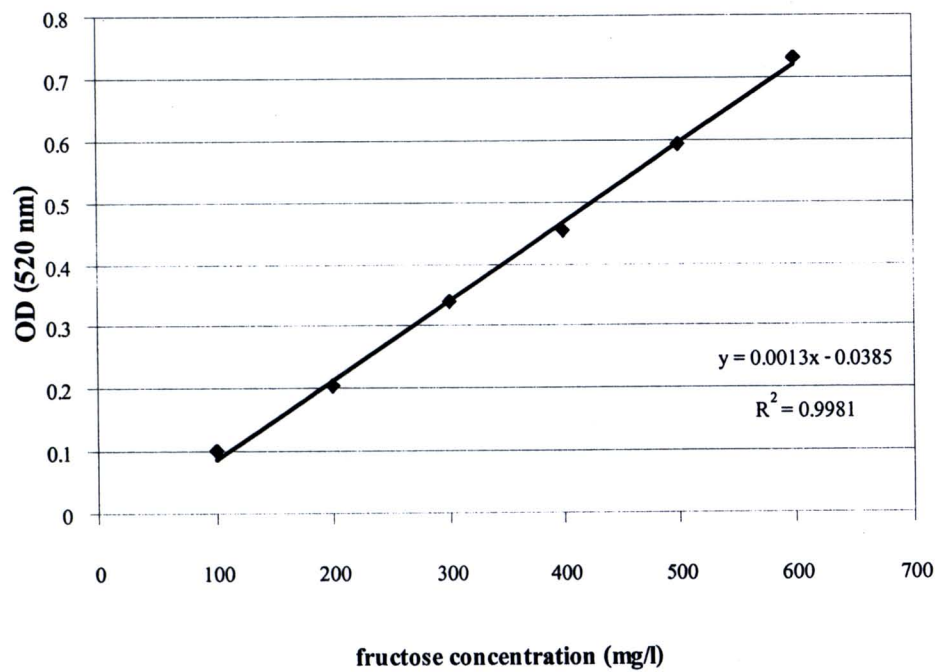
กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

glucose concentration (mg/l)	OD (490 nm)
0	0
1	0.018
5	0.046
10	0.082
25	0.244
50	0.49
75	0.756
100	1.022



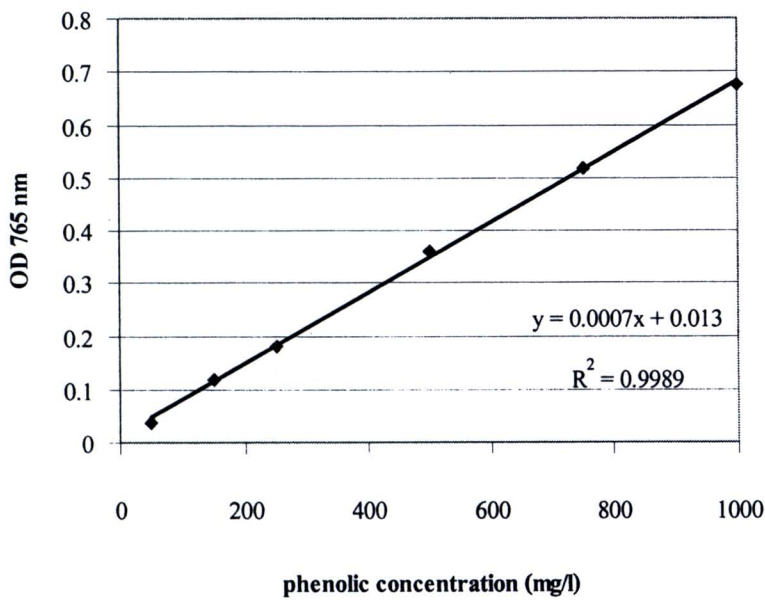
กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

fructose concentration (mg/l)	OD (520 nm.)
100	0.101
200	0.206
300	0.338
400	0.454
500	0.593
600	0.73



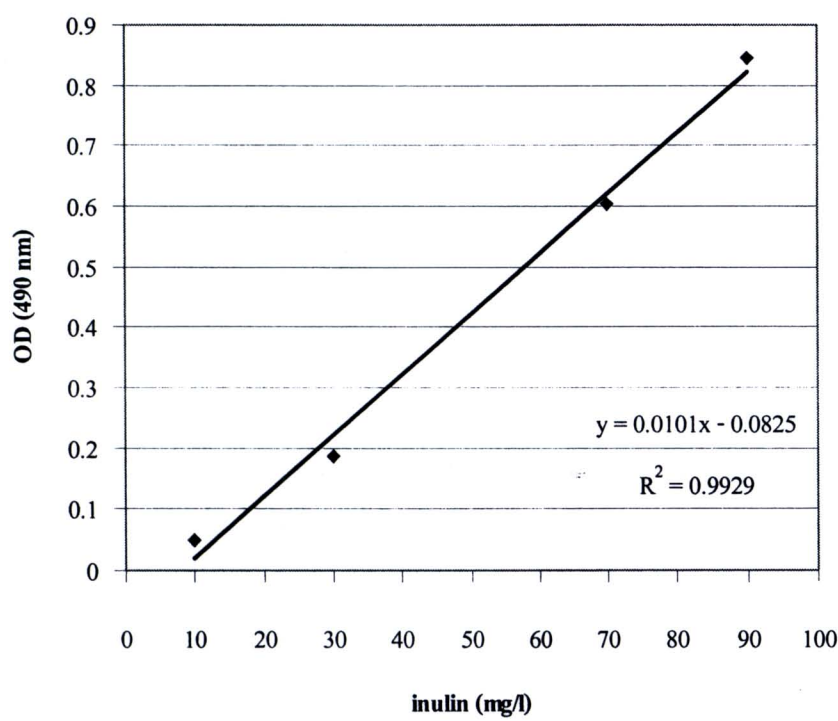
กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound)

phenolic concentration (mg/l)	OD (765 nm.)
50	0.035
150	0.119
250	0.180
500	0.358
750	0.516
1000	0.674



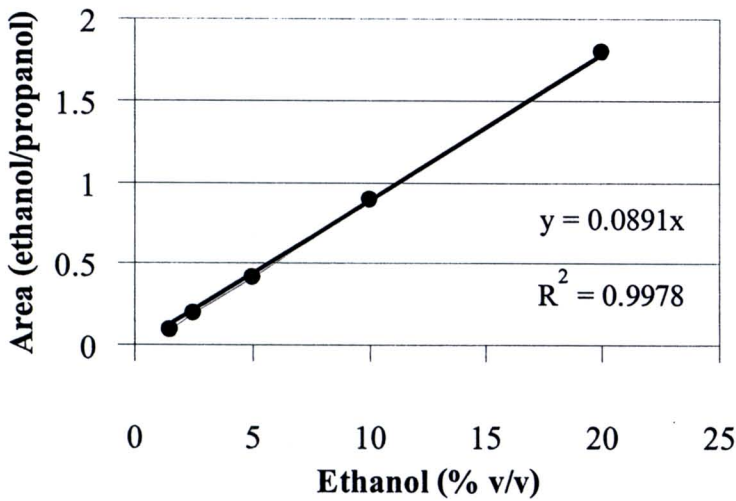
กราฟมาตรฐานอินูลิน (Inulin)

Inulin (mg/l)	OD (490 nm)
10	0.048
30	0.186
70	0.603
90	0.846

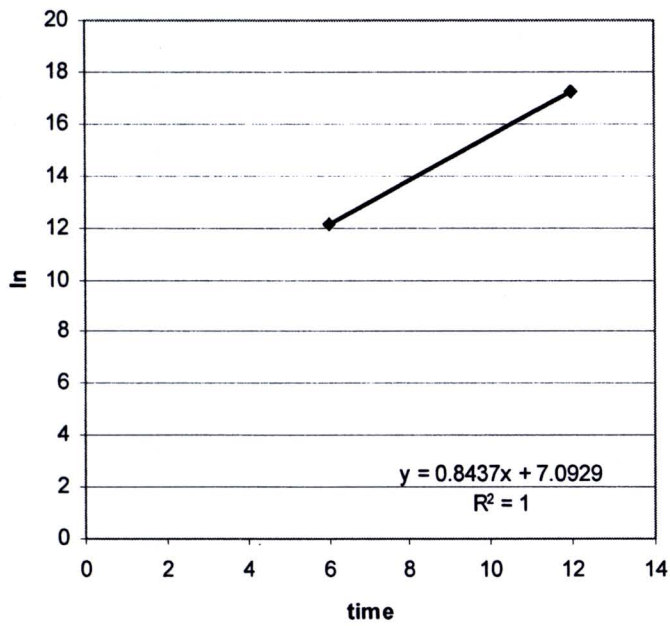


กราฟมาตรฐานเอทานอล (Ethanol)

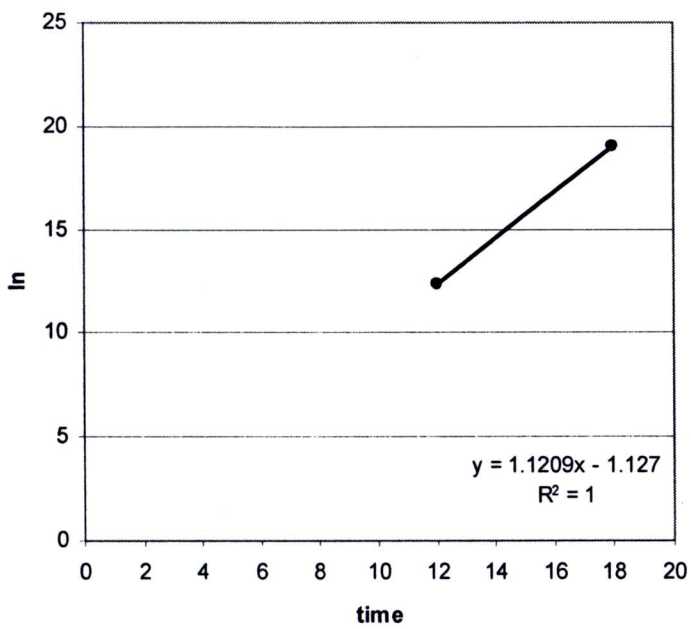
Ethanol (% v/v)	Area (ethanol/propanol)
1.5	0.092
2.5	0.191
5	0.409
10	0.896
20	1.796



ภาคผนวก ข
กราฟอัตราการเจริญจำเพาะ



กราฟแสดงการหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของ *Z. mobilis* TISTR 548 ในอาหารเหลว YPG โดยวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรง (viable cell count)



กราฟแสดงการหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ของ *Z. mobilis* TISTR 548 ในน้ำสกัดจากหัวแค้นตะวัน โดยวิธีนับจำนวนเซลล์โดยตรง (viable cell count)

ภาคผนวก ฅ

องค์ประกอบของน้ำคั้นจากหัวแค้นตะวันหลังผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบของน้ำคั้นจากหัวแค้นตะวันตกวันหลังผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars)	157 (g/l)
ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส (Fructose)	139.00 (g/l)
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (Glucose)	11.7 (g/l)
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (Sucrose)	6.3 (g/l)



