รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกศกมล ไทยทอง. 2542. ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จรูญ คำนวณตา, ประดิษฐ์ ครุวัณณา, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และ วิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2525. รายงานการสำรวจการหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานแห่งหนึ่งในช่วงวิกฤติการของการหมัก. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1:6-13.

ณัฐศิษฎ์ ไทยตระกูล. 2528. บทบาทของแบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2530. เทคนิกการหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์จาก กากน้ำตาล. รายงานการค้นคว้าวิจัยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร 2526-2530. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทรา มณีธวัช. 2520. กากน้ำตาล. วารสารน้ำตาล. 13: 1-8.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธ์ และ จรัญ เจนตนะจิตร. 2527. การผลิตแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่องใน Tower fermenter. วารสารการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง ประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Aiba, S. , Humphrey, A. E. , and Millis, N. F.1973. Continuous culture. In Biochemical Engineering, 2nd edition, pp. 128-162. New York: Academic Press

Aiba, S. , Shoda, M. , and Nagatani, M. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering 10: 845-846.

Alexopoulos, C. J. 1962. Higher fungi. In Introduction Mycology, 2nd edition, pp. 217-492. New York: Wiley.

Bailey, J.E. and D.F. Ollis. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Book Company, Singapore.

Barnett, J. A. , Payne, R. W. , and Yarrow, D. 1983. Yeasts Characteristics and Identification. Cambridge: Cambridge University Press.

Berry, D. R. , and Brown, C. 1987. Physiology of yeast growth. In D. R. Berry, et al. (eds.), Yeast Biotechnology, pp. 159-187. London: Allen and Unwind.

Brown, S. W. , Oliver, S. G. , Harrison, D. E. F. , and Righelato, R. C. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: difference in the magnitude and complexity of the effect European. Journal of Applied Microbiology and Bioengineering 11: 151-155.

Burrows, S. 1970. Baker's yeast. In A. H. Rose, and J. S. Harrison (eds.), The Yeasts, vol. 3, pp. 349-420. London: Academic Press.

Chang, H. M. , Yoo, I. K. , and Kim, B. S. 1994. High density cell culture by membrane based cell recycle. Biotechnology Advances 12: 467-487.

Chang, I. S. , Kim, B. H. , Lee, W. K. , and Shin, P. K. 1995. Bacterial contamination and its effect on ethanol fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology 5: 309-314.

Cooper, T. G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In J. N. Strathern et al. (eds.), The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, pp. 39-99. New York: Cold Spring Harbor Laboratories.

Dellweg, H. , Bronn, W. K. , and Hartmeier, W. 1977. Respiration rate of growing and fermenting yeast. Kem Kami 4: 611-615.

Gaden, E. L. , JR. 1977. Fermentation process kinetics. In R. W. Thoma (ed.), Industrial Microbiology, pp. 252-268. USA: Dow den, Hutchison and Ross.

Galazzo, J. L. and Bailey, J. E. 1990. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. Biotechnology and Bioengineering 36: 417-426.

Godia, F. , Casas, C. , and Sola, C. 1987a. Mathematical modelization of a packed-bed reactor performance with immobilized yeast for ethanol fermentation. Biotechnology and Bioengineering 30: 836-843.

Godia, F. , Casas, C. , and Sola, C. 1987b.Immobilized cells: behavior of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 26: 342-346.

Gosmann, B. , and Rehm, H. 1988. Influence of growth behavior and physiology of alginate- entrapped microorganism; on the consumption. Applied Microbiology and Biotechnology 29: 554-559.

Harrison, J. S. , and Graham, J. C. J. 1970. Yeast in distillery practice. In A. H. Rose, and J. S. Harrison (eds.), The Yeasts, vol. 3, pp. 283-348. London: Academic Press.

Hodge, H .M. , and Hildebrandt, F. M. 1954. Alcoholic fermentation of molasses. In L. A. Underkofler. , and R. J. Hickey (eds.), Industrial Fermentation, vol. 1, pp. 73-93. New York: Chemical.

Honorato, F. L. , Rodrigurs, M. I. , and Maugeri, F. 1999. Dynamic modeling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 74: 176-182.

Hottiger, T. , Boller, T. , and Wiemken, A. 1987. Rapid change of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. FEBS Letter 220: 113-115.

Johnstone, J. H. , and Barford, J . P. 1991. Continuous growth of *Saccharomyces cerevisiae* on a mixture of glucose and fructose. Journal of General Applied Microbiology 37: 133-140.

Jones, R. P. , and Greenfield, P. F. 1984. A review of yeast ionic nutrition, Part 1: Growth and fermentation requirements. Process Biochemistry 19: 48-60.

Jones, R. P. , Pamment, N. , and Greenfield, P. F. 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environment and other variables. Process Biochemistry 16: 42-49.

Kobayashi, M. , Ishida, K. and Shimizu, K. 1995. Efficient production of ethanol by a fermentation system employing temperature profiling and recycle. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 63: 144-146.

Kuriyama, H. , Ishibashi, H. , Umeda, I. , Murakami, T. , and Kobayashi, H. 1993. Control of yeast flocculation activity in continuous ethanol fermentation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 26:125-129.

Kuriyama, H. , Mahakaenchanakul, W. , Matsui, S. , and Kobayashi, H. 1993. The effects of pCO_2 on yeast growth and metabolism under continuous fermentation. Biotechnology Letters 15: 189-194.

Lafforgue- Delorma, C. , Delorma, P. , and Goma, G. 1994. Continuous alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* recycle by tangential filtration: key points for process modeling. Biotechnology Letters 16: 741-746.

Limtong, S. , Saki, T. , and Taguchi, H. 1985. Effect of inorganic salts on ethanol production, medium on flocculation and simulation of ethanol production. Annual Reports of ICME 8: 315-321.

Ling, Z. Y. , Morimura, S. , and Kida, K. 1995. Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering 80: 204-207.

Maia, A. B. R. A. , and Nelson, D. L. 1993. Application of Gravitational sedimentation to efficient cellular recycling in continuous alcoholic fermentation. Biotechnology and Bioengineering 41: 361-369.

Maiorella, B. , Blanch, H. W. , and Wilke, C. R. 1983. By-product inhibition effects ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 15: 103-121.

Maiorella, B. L. , Blanch, H. W. , and Wilke, C. R. 1984. Feed component inhibition in ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 26: 1155-1166.

Marison, I. W. 1988. Growth kinetic. In A. H. Scragg (ed.), Biotechnology for Engineers: Biological System in Technological Process. Chi Chester: Ellis Harwood.

Morais, P. B. , Rosa, C. A. , Linardi, V. R. , Carazza, F. and Nonato, E. A. 1996. Production of fuel alcohol by *Saccharomyces* strains from tropical habitats. Biotechnology Letters. 18: 1351-1356.

Nagashima, M. , Azuma, M. , Noguchi, S. , Inozuka, K. , and Samejimat, H. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. Biotechnology and Bioengineering 26: 992-997.

Nagodawithana, T. W. 1991. Baker's yeast production. In G. Reed and T. W. Nagodawithana. Yeast Technology, 2nd edition. New York: AVI Publishing Co. Inc.

Oliva, N. P. , and Yokoya, F. 1997. Effect of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* with *Saccharomyces cerevisiae* in alcohol fermentation. Revista de Microbiologia 28: 25-32.

Paturau, J. M. 1969. Byproducts of Cane Sugar Industry. Amsterdam's: Elsevier.

Paturau, J. M. 1989. Sugar series. Byproduct of the Cane Sugar, 3rd edition. Amsterdam: Elsevier.

Prescott, S. C. , and Dunn, G. G. 1959. Industrial Microbiology. New York: McGraw-Hill, Inc.

Rainbow, C. 1971. Spoilage organism in breweries. Process Biochemistry 10: 15-31.

Reed, G. , and Nagodawithana, T. W. 1991. Yeast Technology, 2nd edition. New York: AVI Publishing Co. Inc.

Reed, G. , and Peppler, H.J. 1973. Yeast Technology. Connecticut: AVI.

Rose, A. H , and Harrison, J. S. 1970. The Yeast. vol. 2. London: Academic Press.

Rose, A. H. , and Harrison, J. S. 1971. The Yeast, vol. 3. London: Academic Press.

Rose, A. H. 1977. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In A. H. Rose (ed.), Economic Microbiology, vol. 1: Alcoholic Beverage, pp. 1-37. London: Academic Press.

Roukas, T. 1994. Ethanol production from nonsterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces* cell using fed batch culture. Biotechnology and Bioengineering 43: 189-194.

Ryu, D. Y. , Kim, Y. J. , and Kim, J. H. 1984. Effect of air supplement on the performance of continuous ethanol fermentation system. Biotechnology and Bioengineering 26: 12-16.

Schmidt, G. L. and Thamhauser, S. J. 1949. The effect of potassium ions on the absorption of orthophosphate and the formation of metaphosphate by baker's yeast. Journal of Biological Chemistry 178: 733-742.

Sheoran, A. , Yadav, B. S. , Nigam, P. and Singh, D. 1998. Continuous ethanol production from sugar cane molasses using column reactor of immobilized Saccharomyces cerevisiae HAU-1. Journal of Basic Microbiology 38: 123-128.

Shojaosadati, S. A. , Sanaei, H. R. , and Fatemi, S. M. 1996. The use of biomass and stillage recycle in conventional ethanol fermentation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 67: 362-366.

Siess, M. H. , and Divies, C. 1981. Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in polyacrylamide gel and performing alcoholic fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 20: 10-15.

Stanbury, P. F. , and Whitaker, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press.

Vives, C. , Casas, C. , Godia, F. , and Sola, C. 1993. Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth. Applied Microbiology and Biotechnology 30: 467-472.

Walker, G. M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. England: John Wiley and Sons.

Watson, K. 1982. Unsaturated fatty acid but not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. Biotechnology Letters 4: 397-402.

White, J. 1954. Yeast Technology. London: Chapman & Hall.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Yeast - Malt Extract : YM)

1.1อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง (agar slant)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0 กรัม
เปปโตน (peptone)	10.0 กรัม
เดรกซ์โทส	20.0 กรัม
วุ้นผง	20.0 กรัม
พีเอช	6.2

ละลายอาหารในน้ำขจัดไอออน นำไปต้มให้วุ้นละลาย ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อขณะร้อนใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร หลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยฝาเกลียวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหารมีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร รอจนอาหารแข็งตัวจึงเก็บเข้าตู้เย็นเพื่อไว้ใช้ต่อไป

1.2 อาหารเหลว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10.0 กรัม
เปปโตน (peptone)	10.0 กรัม
เดรกซ์โทส	20.0 กรัม
พีเอช	6.2

ละลายอาหารในน้ำขจัดไอออน ใส่อาหาร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเซลล์ยีสต์

2.1การเตรียมกากน้ำตาลสำหรับผลิตเซลล์ยีสต์

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำขจัดไอออนในอัตราส่วน 1:1 ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำกากน้ำตาลที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส (ข้อ 2.6.3)

2.2 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเซลล์(อาหารสูตร A)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส	50.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	3.0 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0 กรัม

พีเอช 4.5

แยกฆ่าเชื้อกากน้ำตาลโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และฆ่าเชื้อสารอื่นโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และหาปริมาณตะกอนในอาหารกากน้ำตาลก่อนเติมเชื้อยีสต์ วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข้อ 2.6.1)

2.3 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเซลล์ที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่อง (อาหารสูตร B)

สูตรอาหารเช่นเดียวกับ ภาคผนวก ก -2.2 แต่ปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 20 - 100 กรัมต่อลิตร ตามกำหนดการทดลองข้อ 3.1.4

3. อาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล

3.1 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล

เตรียมกากน้ำตาลเช่นเดียวกับภาคผนวก ก -2.1

3.2 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอล(อาหารสูตร C)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครส	100.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0 กรัม

พีเอช 4.5

แยกฆ่าเชื้อกากน้ำตาลโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และฆ่าเชื้อสารอื่นโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และหาปริมาณตะกอนในอาหารกากน้ำตาลก่อนเติมเชื้อยีสต์ วิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข้อ 2.6.1)

3.3 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอลที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบต่อเนื่องระบบเซลล์อิสระ(อาหารสูตร D)

สูตรอาหารเช่นเดียวกับ ภาคผนวก ก-3.2 แต่ปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 170 - 200 กรัมต่อลิตร ตามกำหนดการทดลองข้อ 3.2.3

3.4 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์ยีสต์ (อาหารสูตร E)

เตรียมโดยเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10.0 กรัม ลงในสูตรอาหารกากน้ำตาลในภาคผนวก ก-3.2 และปรับความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครส 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ตามกำหนดการทดลองข้อ 3.2.4 - 3.2.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.2 นอร์มัล

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออน

2. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5 - dinitrosalicylic acid : DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) 4 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่งสารโซเดียมอัลจิเนต 6 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนของแข็งละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) 2 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่งสารแคลเซียมคลอไรด์ 9 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจนของแข็งละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard)

สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้คือ โพรพานอล (n - propanal) เข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งสารละลายโพรพานอลบริสุทธิ์ที่ใช้ (99.5%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีน้ำหนักเท่ากับ 0.8040 กรัม ดังนั้นปิเปตสารละลายโพรพานอลบริสุทธิ์ 1.875 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนให้ครบ 50 มิลลิลิตร

6. สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐาน 0-100 กรัมต่อลิตร

สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol 99.8%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีน้ำหนักเท่ากับ 0.7908 กรัม ดังนั้นปิเปตสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มา 0.253, 0.507, 0.760, 1.014 และ 1.267 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐานเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายในจากข้อ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

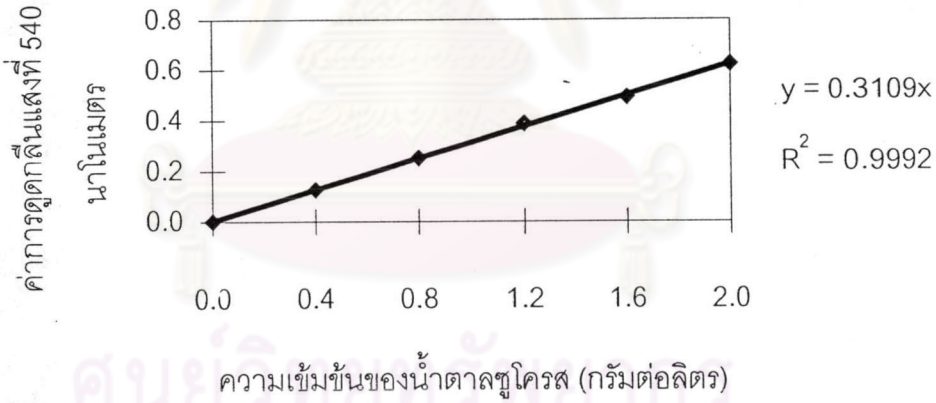
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส

ตารางที่ ค - 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0.0	0
0.4	0.125
0.8	0.250
1.2	0.385
1.6	0.490
2.0	0.620



รูปที่ ค - 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วงความเข้มข้น 0.0 - 2.0 กรัมต่อลิตร

จากกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครสมีค่าสหสัมพันธ์ = 0.9992

ค่าความชัน = 0.3109

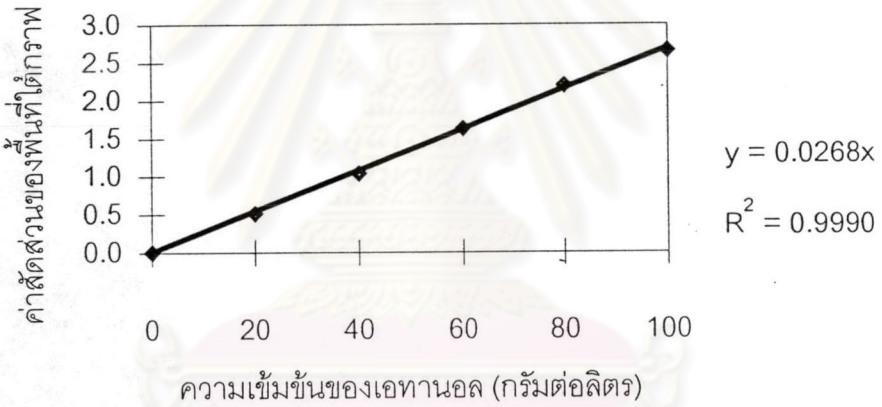
ดังนั้นปริมาณน้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)

= ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร x 1/ความชัน x ความเจือจาง

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์

ตารางที่ ค - 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ

ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอล ต่อพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน
0	0
20	0.5108
40	1.0384
60	1.6242
80	2.1918
100	2.6553



รูปที่ ค - 2 กราฟมาตรฐานของเอทานอลสัมบูรณ์

จากกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเอทานอลมีค่าสหสัมพันธ์ = 0.9990

ค่าความชัน = 0.0268

ดังนั้นปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) =ค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟ x 1/ความชัน

ภาคผนวก ง
การคำนวณ

1.วิธีการคำนวณการนับเซลล์ยีสต์โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์

แผ่นนับเชื้อมีระยะห่างระหว่างแชมเบอร์ (chamber) ถึงแผ่นแก้วปิด (cover slip) เท่ากับ 1/10 มิลลิเมตร

พื้นที่ของ 5 ช่องที่นับ	=	5 x 1/5 x 1/5	=	1/5	ตารางมิลลิเมตร
ปริมาตรของ 5 ช่องที่นับ	=	1/5 x 1/10	=	1/50	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติว่าใน 5 ช่องนับเชื้อจุลินทรีย์ได้			=	Z	เซลล์
ปริมาตร 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับได้			=	Z	เซลล์
ถ้าปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร			=	50,000Z	เซลล์

หมายเหตุ : ในกรณีที่ทำการเจือจาง ต้องนำค่าแฟคเตอร์การเจือจาง (dilution factor) มาคูณด้วย เช่น เจือจาง 1: 10,000 (10^{-4}) มีจำนวนเชื้อ 57 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจำนวนเชื้อที่ไม่ได้เจือจางในน้ำหมักเท่ากับ 57×10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.ค่าจลนพลศาสตร์ของการเจริญ

2.1 วิธีคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

จากสมการที่ว่า $dx/dt = \mu x$ (1)

โดย dx/dt = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงเวลาหนึ่ง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

x = ความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

เมื่ออินทิเกรทสมการ (1) จะได้ $x_t = x_0 e^{\mu t}$ (2)

โดย x_0 = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

x_t = ความเข้มข้นของเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

ใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

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

ดังนั้นอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = $(\ln x_t - \ln x_0) / \Delta t$

2.2 วิธีคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง

น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงเป็นค่าที่บอกว่า ระบบสามารถผลิตเซลล์ได้ปริมาณมากน้อยเพียงไรใน 1 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

= น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

2.3 วิธีคำนวณผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้

ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{x/s}$) คือ อัตราส่วนระหว่างเซลล์ยีสต์ที่ระบบผลิตได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ผลผลิตเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อกรัม)

= น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง) / ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

โดย น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง = ภาคผนวก ง - 2.2

ปริมาณน้ำตาลทีใช้ต่อชั่วโมง = [ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเข้าระบบ (กรัมต่อลิตร) - ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักที่ออกจากระบบ (กรัมต่อลิตร)] x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง(ต่อชั่วโมง)

3. ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักเอทานอล

3.1 วิธีคำนวณหาค่าอัตราจำเพาะของการเกิดผลผลิต (specific production rate)

การเกิด growth - linked product สามารถเขียนสมการได้ดังนี้คือ

$$dp/dt = \nu x \quad (4)$$

โดย dx/dt = อัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของผลผลิตในช่วงเวลาหนึ่ง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

x = ความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

ν = อัตราจำเพาะของการเกิดผลผลิต (ต่อชั่วโมง)

นอกจากนี้การเกิดผลผลิตยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมวลเซลล์ซึ่งเขียนในรูปสมการได้ดังนี้

$$dp/dx = Y_{p/x} = \Delta p/\Delta x \quad (5)$$

โดย $Y_{p/x}$ = ปริมาณผลผลิต (yield of product) ต่อหน่วยสับเสตรทที่ถูกใช้ไป

เมื่อคูณสมการ (5) ด้วย dx/dt จะได้

$$dp/dt = Y_{p/x} \cdot dx/dt \quad (6)$$

แต่ $dx/dt = \mu x$

เพราะฉะนั้น

$$dp/dt = Y_{p/x} \cdot \mu x \quad (7)$$

จากสมการ (4) และ (7) จะได้

$$\nu = Y_{p/x} \cdot \mu x$$

ดังนั้นอัตราการผลิตจำเพาะ (ν) = $\Delta p/\Delta x \cdot \mu$

3.2 วิธีคำนวณหาปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง

ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมงเป็นค่าที่บอกว่า ระบบสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากน้อยเพียงไรใน 1 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

= ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

3.3 วิธีคำนวณหาปริมาณเอทานอลต่อปริมาตรเจลต่อชั่วโมง

ปริมาณเอทานอลต่อปริมาตรเจลต่อชั่วโมงเป็นค่าที่บอกว่า ระบบสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากน้อยเพียงไรต่อปริมาตรของเจลตรึงเซลล์ใน 1 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ปริมาณเอทานอลต่อปริมาตรเจลต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

= ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง) / ปริมาตรของเจลตรึงเซลล์ในถังหมัก (ลิตร)

3.4 วิธีคำนวณผลผลิตเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้

ผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปคือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณเอทานอลที่ระบบผลิตได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ผลผลิตอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อกรัม)

= ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง) / ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

โดย ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง = ภาคผนวก ง - 3.2

ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ต่อชั่วโมง = [ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเข้าสู่ระบบ (กรัมต่อลิตร) - ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักที่ออกจากระบบ (กรัมต่อลิตร)] x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

3.5 วิธีคำนวณผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์

ผลผลิตเอทานอลต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์ คือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณเอทานอลที่ระบบผลิตได้ต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์ในระบบซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ผลผลิตอทานอลต่อน้ำหนักเซลล์ยีสต์ (กรัมต่อกรัม)

= ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง) / น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

โดย ปริมาณเอทานอลต่อชั่วโมง = ภาคผนวก ง - 3.2

น้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมง = ภาคผนวก ง - 2.2

3.6 วิธีคำนวณปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ต่อชั่วโมง

ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมงเป็นค่าที่บอกว่า ระบบสามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ปริมาณมากน้อยเพียงไรใน 1 ชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

จากกฎของแก๊สสมมติ (Ideal gas law) เป็นกฎของแก๊สที่เกิดจากการรวมกฎของ อาโวกาโดร บอยล์ และชาร์ลส์ เข้าด้วยกัน เขียนเป็นสูตรคำนวณได้ดังนี้

$$PV = nRT$$

และ

$$n = g/M$$

โดย P = ความดันแก๊ส (ความดันบรรยากาศ)

V = ปริมาตรแก๊ส (ลิตร)

T = อุณหภูมิแก๊ส (เคลวิน)

n = จำนวนโมลของแก๊ส

g = มวลของแก๊ส (กรัม)

M = มวลโมเลกุลของแก๊ส

R = ค่าคงตัวของแก๊ส = 0.082 ลิตร.ความดันบรรยากาศต่อเคลวินต่อโมล

จากการคำนวณจะได้ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มีหน่วยเป็นกรัม

ดังนั้นปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

= ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (กรัม) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

3.7 วิธีคำนวณผลผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อน้ำตาลที่ใช้

ผลผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้ต่อน้ำตาลที่ใช้ไปคือ อัตราส่วนระหว่างปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระบบผลิตได้ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

ผลผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อกรัม)

= ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง) / ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ต่อชั่วโมง (กรัมต่อชั่วโมง)

โดย ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมง = ภาคผนวก ง - 3.6

ปริมาณน้ำตาลทีใช้ต่อชั่วโมง = [ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเข้าสู่ระบบ (กรัมต่อลิตร) -ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักที่ออกจากระบบ (กรัมต่อลิตร)] x ปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมัก (ลิตร) x อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ค่าทางสถิติ

ตารางที่ จ-1 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณเอทานอลในการทดลองที่ 3.2.4

ANALYSIS OF VARIANCE

COMPLETELY RANDOMIZED DESIGN

ANOVA TABLE

SV	DF	SS	MS	F	
TREATMENT	11	14462.2342	1314.74856	525.29	**
ILUTION RATE (D	1	8955.30534	8955.30534	3577.97	**
SUGAR (U)	1	1873.76817	1873.76817	748.64	**
SIZE (S)	2	202.33222	101.16611	40.42	**
DxU	1	3135.79563	3135.79563	1252.87	**
DxS	2	206.18071	103.09035	41.19	**
UxS	2	82.39664	41.19832	16.46	**
DxUxS	2	6.4555	3.22775	1.29	ns
ERROR	48	120.13912	2.5029		
TOTAL	59	14582.3733			

cv = 3.0 %

** = มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (significant at 1 % level)

ns = ไม่มีนัยสำคัญ (not significant)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ จ-2 ผลการเปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอล ในการทดลองที่ 3.2.4

LSD COMPARISON

DxUXS TABLE OF MEANS FDR ETHANOL (AVE. OVER 5 REPS)

	SUGAR (U)				
SIZE(S)	200	170	S-MEAN	D FF	
D = 0.10					
2.10*3.45	69.828 a	64.368 a	67.098	5.460	**
2.05*5.95	63.940 b	60.680 b	62.310	3.260	**
2.40*5.15	64.176 b	63.050 a	63.613	1.126	ns
D = 0.30					
2.10*3.45	27.404 a	50.024 b	38.714	-22.620	**
2.05*5.95	24.544 b	49.186 b	36.865	-24.64	**
2.40*5.15	29.318 a	58.962 a	44.140	-29.64	**
U-MEAN	46.535	57.712	52.123	-11.18	

** = มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (significant at 1 % level)

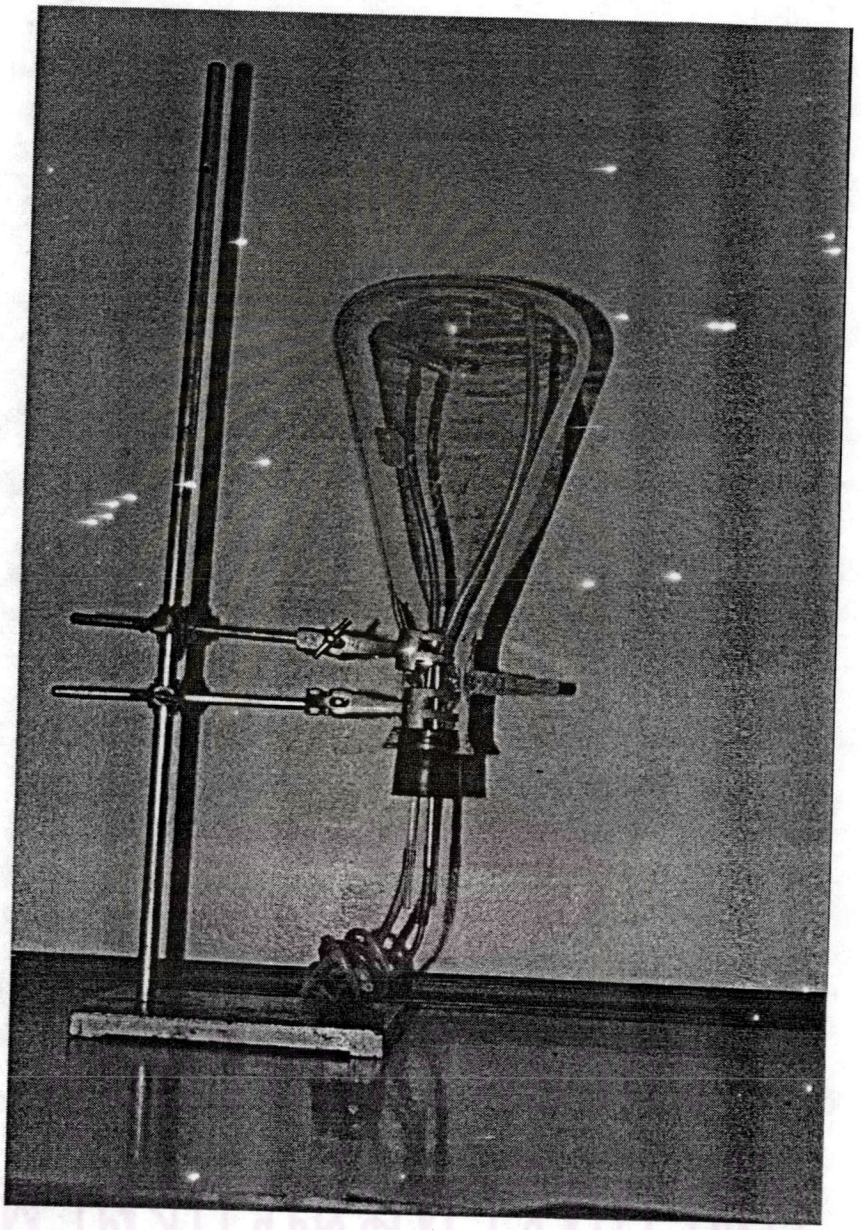
ns = ไม่มีนัยสำคัญ (not significant)

อักษรที่เหมือนกันของแต่ละ Dในแนวตั้ง (a และ b) แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

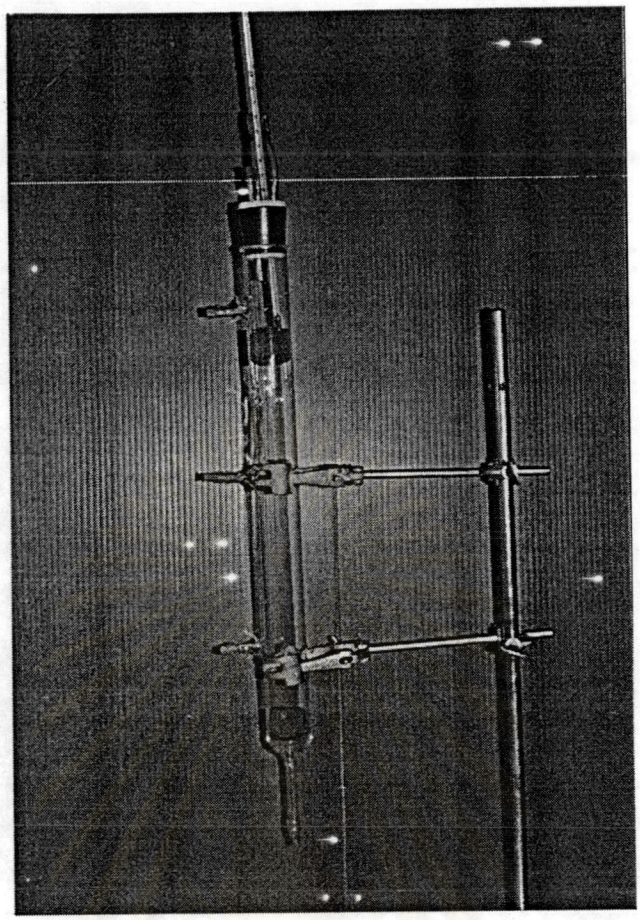
Compariso	S.E.D.	LSD(5%)	LSD(1%)
2-D*U*S m	1.001	2.012	2.684

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

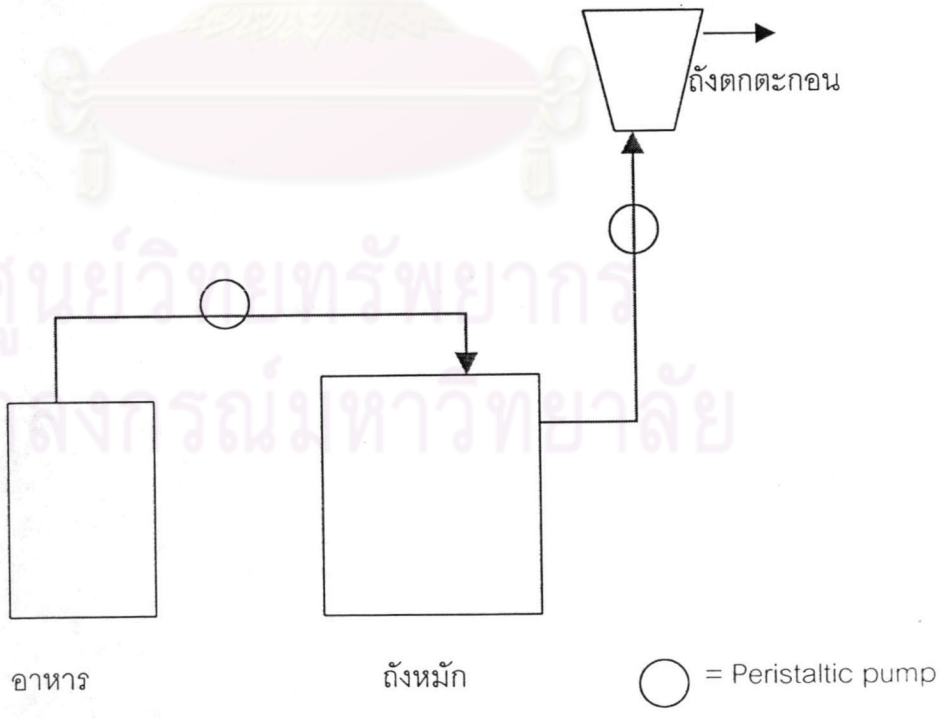
ภาคผนวก ฉ
รูปและแผนภาพ



รูปที่ ฉ-1 ถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร

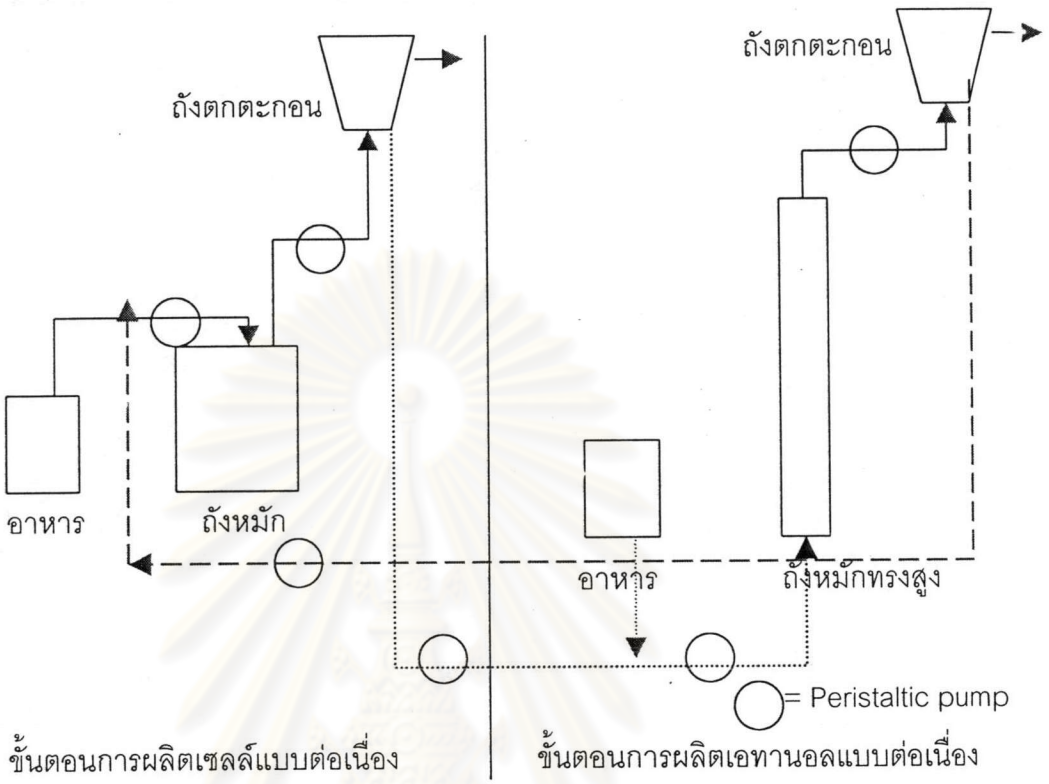


รูปที่ ฉ-2 ถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร

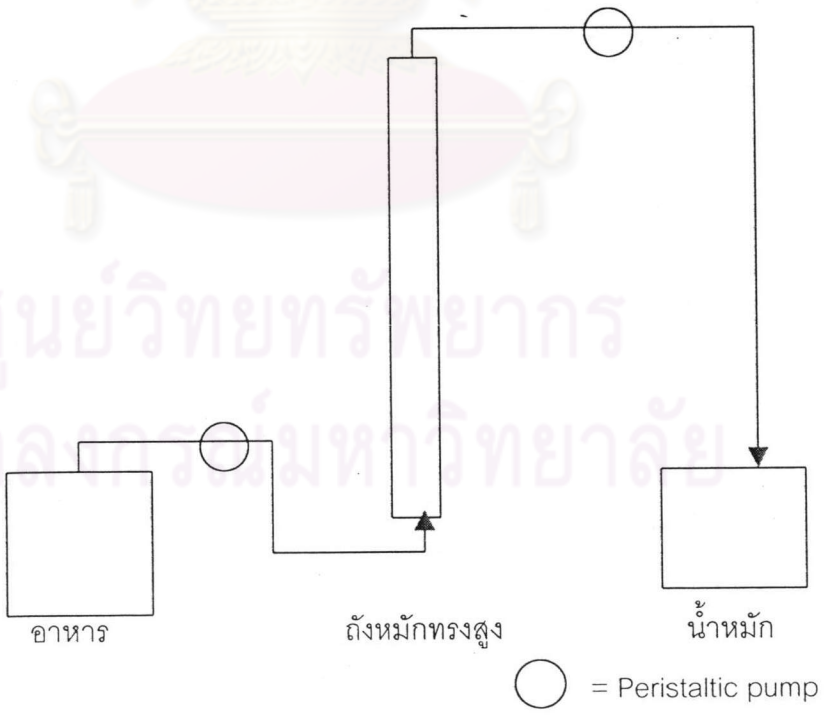


รูปที่ ฉ-3 แผนภาพแสดงการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องพร้อมถังตกตะกอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ฉ-4 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์



รูปที่ ฉ-5 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์ยีสต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว เพ็ญนภา สีมา เกิดวันที่ 30 ตุลาคม พ.ศ. 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 จากนั้นได้เข้าทำงานในตำแหน่งเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ บริษัทยูไนเต็ดฟีดมิลล์ จำกัด ที่จังหวัดสระบุรี เป็นระยะเวลา 2 ปี และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย