รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. กรุงเทพฯ: บริษัท แปลน พริ้นติ้ง จำกัด.

คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ. 2542. พรรณไม้น้ำในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana* Perrine. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิสุทธิ์ พวงนาค. 2542. การกลายพันธุ์ของรา *Acrophialophora* sp. ที่ย่อยสลายเซลลูโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทธานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันทนา เสถียรไพศาล. 2539. การเปลี่ยนเชิงชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสเป็นเอทธานอลด้วยวิธีการย่อยสลายและการหมักแบบต่อเนื่องโดย *Acrophialophora* sp. และ *Candida brassicae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรชัย มัจฉาชีพ. 2538. วัชพืชในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แพร่พิทยา.

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Fattah, W. R., Fadil, M., Nigam, P, and Banat, I. M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian Distillery. Biotechnology and Bioengineering. 68 (5): 531-535.

Aldridge, S. 2000. The Agbiotech Revolution In J. Sterling (ed.). Genetic Engineering News. USA: Mary Ann Liebert.

AOAC, 1984. Official method of analysis. 14 th ed. C. E. Jones (ed.), pp. 153. USA: The William Byrd Press.

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 Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 259-263.

Belkacemi, K., Turcotte, G., De Halleux, D., and Savoie, P. 1998. Ethanol production from AFEX-treated forages and agricultural residues. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 70-72. In M. Finkelstein and B. H. Davison (eds.), Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 441-462. New Jersey: Humana Press.

Berry, D. R. 1989. Growth of Yeast. In J. O. Newang (ed.), Fermentation process development of industrial organisms (Bioprocess Technology. V. 4), pp. 277-311. New York: Marcel Dekker.

Blackburn, B., MacDonald, T., McCormack, M., Perez, P., and Tiengco, V. 1999. Evaluation of biomass-to-ethanol fuel potential in California. California Energy Commission Docket 1999-12-22-500-99-022.

Blotkamp, P. J., Takagi, M., Pemberton, M. S., and Emert, G. H. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose and simultaneous fermentation to alcohol. AIChE Symposium Series No. 181. 74: 85-90.

Bor, N. L. 1960. The Grasses of Burma, Ceylon, India and Pakistan, vol. 1. R. C. Rollins and G. Taylor (eds.). USA: Pergamon Press.

Boyle, M. Barron, N., and McHale, A. P. 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Biotechnology Letters. 19 (1): 49-51.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Bungay, H. R. 1981. Fractionation and Pretreatment. In Energy, The Biomass Options, pp. 185-201. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Chang, V. S., Kaar, W. E., Burr, B., and Holtzapple, M. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. Biotechnology Letters. 23: 1327-1333.

Chapman, H. D. and Pratt, P. F. 1961. Methods of analysis for soils, plants and water. University of California, Davis, Department of Agricultural Science.

Chongpeerapien, T., Sungsuwan, S., Kritiporn, P., and Buranajja, S. 1990. Energy and Environment: Choosing the Right Mix. The 1990 TDRI Year-End Conference, Industrializing Thailand and the Impact on the Environment. Ambassador City Jomtien, Chonburi.

Eriksson, K. - E. L., Blanchette, R. A. and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component. Germany: Springer – Verlag.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry. 59: 257-268.

Ghose, T. K., and Bissaria, V. S. 1987. Measurement of hemicellulase activities Part 1: Xylanase. International Union of Pure and Applied Chemistry. 59 (2):1739-1752.

Gibbs, D. 1998. Global warming and the need for liquid fuels from biomass. BioEnergy'98. Proc. Eight National Bioenergy Conference, Madison, WI, Oct. 4-8, 1998. pp. 1344-1353.

Gilliland, H. B.1971. Grasses of Malaya Vol. 3 .SNP Publishers Pte. pp. 44-230.

Goering, H. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagent, Producers, and Some Application). In Agriculture Handbook No. 379, p. 20. United States of Agriculture, Washington, DC.

Hack, C. J., and Marchant, R. 1998. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 20: 323-327.

Hall, D. O., Rosillo-Calle, F., Willium, R. H., and Woods, J. 1993. Biomass for Energy : Supply Prospects. In T. Johansson (ed.), Renewable Energy: Sources for Fuels and Electricity. Washington: Island Press.

Harada, J., Paisooksantivatana, Y. and Zungsontiporn, S. 1987 .Weeds in the Highland of Northern Thailand. Botany and Weed Science Diviosion, Department of Agriculture. Bangkok, Thailand. pp. 19-33.

Hsu, T. 1996. Pretreatment of Biomass. In C. E. Wyman (ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, pp. 179-212. Washington, DC: Taylor & Francis.

http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4_54.html

http://www.ott.doe.gov/biofuels/advanced_bioethanol.html

Johansson, J., and Lundqvist, U. 1999. Estimating Swedish biomass energy supply. Biomass and Bioenergy. 17: 85-93.

Kirk, T. K., and Farrell, R. L. 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology. 41: 465-505.

Klass, D. L., 1998. Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals. California: Academic Press.

Koegel, R. G., Sreenath, H. K., and Straub, R. J. 1997. Liquid hot water (LHW) pretreatment of alfalfa fiber destined for ethanol production. 1997 Research summaries. Retrieved on 11 June 2003. Available from http://www.wisc.edu/RS97_pdfs/FH5.pdf.

Krishna, S. H., Reddy, T. J., and Chowdary, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Bioresource Technology. 77: 193-196.

Leghninger, A. L. 1982. Enzymes, In Principles of Biochemistry, p. 219. New York: Worth Publishers.

Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Scurlock, J. M. O.,and Huisman, W. 2000. Miscanthus: European experience with a novel energy crop. Biomass and Bioenergy. 19: 209-227.

Lewandowski, I., Kicherer, A., and Vonier, P. 1995. CO_2-balance for the cultivation and combustion of *Miscanthus*. Biomass and Bioenergy. 8 (2): 81-90.

Lewandowski, I., Scurlock, J. M. O., Lindvall, E., and Christou, M. 2003. The development and status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. Biomass and Bioenergy. 25 (4): 335-361.

Lynd, L. R., Cushman, J. H., Nichols, R. J., and Wyman, C. E. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science. 251: 1318-1323.

McLaughlin, S. B., and Walsh, M. E. 1998. Evaluating environmental consequences of producing herbaceous crops for bioenergy. Biomass and Bioenergy. 14: 317-324.

McMillan, J. D. 1994. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In M.E. Himmel, J. O. Baker, and R. P. Overend (eds.), Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, ACS Symposium Series 566, pp. 292-324. Washington, DC: American Chemical Society.

Mielenz, J. R. 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Current Opinion in Microbiology. 4 (3): 432-329.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 (3): 426-428.

Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2000. Leghninger Principles of Biochemistry. 3 rd ed. New York: Worth Publishers.

Noda, K., Teerawatsakul, M., Prakongvongs, C. and Chaiwiratnukul, L.1985. Major Weeds in Thailand. 3 rd ed. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Thailand. pp. 26-123.

Norby, M. 2000. It's a grass, grass, grass for biofuel. Research of University of Nebraska-Lincoln, Agricultural Research Division. Available from http://ard.unl.edu/rn/0900/grass.html

Ooshima, H., Burns, D., and Converse, A. 1990. Adsorption of cellulases from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. Biotechnology and Bioengineering. 36: 446-452.

Ortega, N., Busto, M. D., and Perez-Mateos, M. 2000. Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw by *T. reesei* cellulases and *A. niger* β-glucosidase. Biocatalysis and Biotransformation. 18: 311-330.

Oweczkin, J. and Kerven, G. 1980. Method of analysis for nitrogen, phosphorus, sulphur, and potassium in plant tissue. Department of Agriculture, University of Queenland.

Paulrud, S., and Nilsson, C. 2001. Briquetting and combustion of spring-harvested reed canary-grass: effect of fuel composition. Biomass and Bioenergy. 20: 25-35.

Philippidis, G. P. 1996. Cellulose Bioconversion Technology. In C. E. Wyman (ed.), Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, pp. 253-285. Washington, DC: Taylor & Francis.

Phowchinda, O. 1999. Ethanol fermentation from pineapple waste by *Saccharomyces cerevisiae*. Programme and Abstracts, 25th Congress on Science and Technology of Thailand, Pitsanuloke. pp. 824-825.

Prosser, J. I. 1995. Kinetics of filamentous growth and branching. In Neil A. R. Gow and G. M. Gadd (eds.), The growing fungus, pp. 301-318. London: Chapman & Hall.

Pumtong, P., P. Dangkau, and T. Eksittikul. 1999. Carbohydrate and alcohol production from saman in immobilized cell system. Programme and Abstracts. 25th Congress on Science and Technology of Thailand., Pitsanuloke, pp. 782-783.

Punnapayak, H. and Emert, G. H. 1986. Use of *Pachysolen tannophilus* in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulose. Biotechnology Letters. 8 (1): 63-66.

Punnapayak, H. and Hoffmann, J. J. 1994. *Amsonia* spp. as potential fuel crops for arid lands. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 10: 290-292.

Punnapayak, H., Kuhirun, M., and Thanonkeo, P. 1999. Cellulolytic fungi and the bioconvesion of fiber from *Agave sisalana*. Science Asia. 25: 133-136.

Radford, A., Stone, P. J., and Taleb, F. 1996. Cellulase and Amylase Complex. In Brambl and Marzluf (eds.), The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology, pp. 269-294. Germany: Springer-Verlag.

Saha, B. C., and Bothast, R. J. 1997. Enzyme in lignocellulosic biomass conversion. In B. C. Saha, and J. Woodward (ed.), Fuel and Chemicals from Biomass, ACS Symposium Series 666, pp. 46-56. Washington, DC: American Chemical Society.

Saha, B. C., Dien, B. S., and Bothast, R. J. 1998. Fuel ethanol production from corn fiber current status and technical prospects. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 70-72. In M. Finkelstein and B. H. Davison (eds.), Biotechnology for Fuels and Chemicals, pp. 115-124. New Jersey: Humana Press.

Samson, R. A. 1991. Switchgrass: a living solar battery for the prairies. Copyright @ 1991 REAP Canada.

Samson, R. A., Drisdelle, M., Mulkins, L., Lapointe, C. and Duxbury, P. 2000b. The use of switchgrass biofuel pellets as a greenhouse gas offset strategy, REAP Canada.

Samson, R. A., Duxbury, P., Drisdelle, M. and Lapointe, C. 2000a. Assessment of Pelletized Biofuels. PERD Program, Natural Resources Canada, Contract 23348-8-3145/001/SQ.

Samson, R. A. and Mehdi, B. 1998. Strategies to reduce the ash content of perennial

grasses; Expanding Bioenergy Partnerships, Bioenergy 98, Great Lakes Regional Biomass Energy Program, Chicago, Illinois, pp. 1124-1131.

Samson, R. A. and Omielan, J. A. 1992. Switchgrass: A potential biomass energy crop for ethanol production. Thirteenth North American Prairie Conference Proceedings. Windsor. Ontario. pp. 253. August 6-9.

Sander, B. 1997. Properties of Danish Biofuels and the Requirements for Power Production. Biomass and Bioenergy. 12:177-183.

Scurlock, J. M. O. 1998. Miscanthus: a review of European experience with a novel energy crop. ORNL/TM-13732. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. 26 pp.

Smith, J. E. and Aidoo, K. E. 1988. Growth of fungi on solid substrates. In D. R. Berry (ed.), Physiology of Industrial Fungi, pp. 249-269. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Sreenath, H., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W., and Straub, R. J. 1999. Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment. Process Biochemistry. 35: 33-41.

Sreenath, H., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W., and Straub, R. J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. Process Biochemistry. 36: 1199-1204.

Sternberg, D., Vijayakumar, P. and Reese, E. T.1977. β-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Canadian Journal of Microbiology. 23: 139-147.

Tolbert, V. R. and Wright, L. L. 1998. Environmental enhancement of US biomass crop technologies: Research results to date. Biomass and Bioenergy. 15 (1): 93-100.

Viver, D., Ratomahenina, R., Moulin, G., and Galzy, P. 1993. Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Industrial Microbiology. 11: 157-161.

Wade, Jr., L. G., 1995. Structure and synthesis of alcohols. In Organic Chemistry. 3 rd ed. p. 400. New Jersey: Prentice-Hall, Inc.

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

Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M. G., and Amorim, H. V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. Trends in Biotechnology. 17 (2): 482-487.

Wood, T. M. 1989. Mechanisms of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In M. P. Coughlan (ed.), Enzyme system for lignocellulose degradation, pp. 17-35. England: Elsevier Applied Science.

Yu, B. X., Yum, H. S., and Koo, Y. M. 1998. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in a batch fermenter. Journal of Microbiology and Biotechnology. 8 (6): 575-580.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	16	กรัม
น้ำกลั่น		

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น เมื่อสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคสแล้วปรับปริมาตรให้ใกล้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เติมวุ้นแล้วต้มจนวุ้นละลายหมด สุดท้ายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร PDA แต่ไม่ใส่วุ้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	16	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Yeast Malt Agar (YMB)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร YMA แต่ไม่ใส่วุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. Production medium (Punnapayak and Emert, 1986)

$MgSO_4.7H_2O$	1	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4	กรัม
$CaHPO_4.2H_2O$	5	กรัม
Corn steep liquor	7	กรัม
α-cellulose	30	กรัม
Tween 80	2	มล.
$FeSO_4$	5	มก.
$ZnSO_4$	1.4	มก.
$MnSO_4$	1.6	มก.
$CoCl_2$	3.6	มก.
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น α-cellulose Tween 80 และ $CaHPO_4.2H_2O$ ปรับปริมาตรให้ใกล้เคียง 1 ลิตร แล้วปรับ pH เท่ากับ 5.0 เติม Tween 80 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร สำหรับ α-cellulose และ $CaHPO_4.2H_2O$ ให้ชั่งแยกแต่ละฟลาส์ก

6. F2 medium (Punnapayak, Kuhirun, and Thanonkeo, 1999)

$(NH_4)_2SO_4$	30	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	2.2	กรัม
$CaCl_2$	1.2	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกจากกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. สารละลาย Neutral Detergent

1.1 ชั่ง Disodium ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 16.18 กรัม และ Sodium borate decahydrate ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) 6.81 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ นำไปต้มจนละลายหมด

1.2 ละลาย Sodium lauryl sulphate 30กรัม ในน้ำ แล้วเติม 2 -Ethoxyethanol (Ethylene glycol monoethyl ether) 10 มิลลิลิตร

1.3 นำสารละลายในข้อ 1.1 มาผสมกับสารละลายในข้อ 1.2

1.4 ชั่ง Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4) 4.56 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ แล้วนำไปต้มจนละลายหมด นำไปผสมกับสารละลายผสมที่ได้ในข้อ 1.3 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.9-7.1

2. สารละลาย Acid Detergent

ละลาย Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) 20 กรัม ในกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 N แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดนี้ให้ได้ 1 ลิตร

3. สารละลาย Saturated potassium permanganate

ละลาย Potassium permanganate ($KmnO_4$) 50 กรัม และ Silver sulphate (Ag_2SO_4) 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ในขวดแก้วสีชา อย่าให้โดนแสงแดด

4. สารละลาย Lignin buffer

ละลาย Ferric nitrate nanohydrate [$Fe(NO_3)_3.9H_2O$] 6 กรัม และ Silver nitrate ($AgNO_3$) 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Acetic acid glacial 500 มิลลิลิตร เติม Potassium acetate 5 กรัม และเติม Tertiary butyl alcohol 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. สารละลาย Combined permanganate

ผสมสารละลาย Saturated potassium permanganate กับ สารละลาย Lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บสารละลายผสมนี้ในขวดสีชา แช่ในตู้เย็นไม่ให้ถูกแสงแดด ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแล้วจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

6. **สารละลาย Demineralizing**

ละลาย Oxalic acid dihydrate 50 กรัม ใน ปริมาตร 700 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร และ Hydrochloric acid (HCl) 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. **สารละลาย 80% ethanol**

ผสม 95% Ethanol 843 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 157 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

การเตรียมสารเคมีสำหรับการหาปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืช

1. **สารละลาย 2 N Ammonium acetate**

ละลาย Ammonium acetate 144 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร

2. **สารละลาย 0.25% Gum acacia**

ละลาย Gum acacia 0.25 กรัม ในน้ำอุ่น ปรับปริมาตรจนได้ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

3. **สารละลายอิ่มตัวของ Barium chloride**

ละลาย Barium chloride 66 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 183 มิลลิลิตร

4. **สารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลาย Calcium sulfate 0.537 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

1. **DNS reagent**

1.1 เตรียมสารละลาย NaOH 10% ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ phenol 10 กรัม จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม $NaOSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย DNS 1% ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochelle salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5% ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1% คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายจากข้อ 1.1 และ 1.2 เทรวมกัน จะได้ DNS reagent เก็บไว้ในขวดสีชา แล้วแช่ตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน จึงนำไปใช้

2. **0.05 M Citrate buffer pH 4.8**

ละลาย Sodium citrate (MW = 210.14 g/mol) 7.6466 กรัม ในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร

แล้วเติม Citric acid 5.0434 กรัม ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 4.8 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. **0.025 M Citrate buffer pH 4.5**

ละลาย Sodium citrate (MW = 210.14 g/mol) 1.2940 กรัม ในน้ำกลั่น 490 มิลลิลิตร

4. **สารละลาย Carboxymethyl cellulose (CMC) ความเข้มข้น 2%**

ละลาย CMC 2 กรัม ด้วย 0.05 M citrate buffer แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วเติม Citric acid 1.6958 กรัม ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. **สารละลาย Salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร**

ละลาย D-salicin 0.4 กรัม ด้วย 0.025 M citrate buffer ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนส

1. **Reagent A**

ชั่ง	$NaCO_3$	25	กรัม
	Rochelle salt	25	กรัม
	$NaHCO_3$	20	กรัม
	$NaSO_4$	200	กรัม

ละลายสารดังกล่าวให้เข้ากัน ปรับปริมาตรโดยใช้ขวดวัดปริมาตรให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

2. **Reagent B (Copper alkaline reagent)**

ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 15 กรัม ละลายน้ำจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 2 หยด

3. **Reagent C**

เตรียมโดยปิเปต Reagent A 25 มิลลิลิตร ผสมกับ Reagent B 1 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

4. **Reagent D (Arsenomolybdate reagent)**

ชั่ง Ammonium molybdate 25 กรัม ละลายในน้ำ 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ขณะกวนให้เข้ากัน

จากนั้นเติม $Na_2HaSO_4.7H_2O$ ที่ละลายอยู่ในน้ำ 25 มิลลิลิตรลงไป แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ใส่ในขวดสีชา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

5. **การเตรียม 50 mM phosphate buffer pH 7**

เตรียม stock solution ของ 0.2 M phosphate buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยเตรียมได้จาก stock solution 2 ชนิด คือ

5.1 เตรียม 0.2 M $NaH_2PO_4.2H_2O$; MW = 156.01) โดยชั่งสาร 15.60 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

5.2 เตรียม 0.2 M $Na_2HPO_4.2H_2O$; MW = 177.96) โดยชั่งสาร 17.79 กรัม ละลายน้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

เตรียม 50 mM phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ 0.2 M phosphate buffer ปริมาตร 62.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบ 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

1. สารละลาย Biuret reagent

ถ้าต้องการเตรียมสารละลาย Biuret reagent ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 0.75 กรัม และ Rochelle salt (Potassium sodium tartrate) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 10% ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ SSF

1. 0.04 M Sodium acetate buffer pH 5.0

ชั่ง Sodium acetate 0.3456 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 990 มิลลิลิตร เติม Acetic acid (conc.) ปริมาตร 0.83 มิลลิลิตร นำไปวัด pH แล้วปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยใช้ 1 N Sodium hydroxide

2. Normal saline 0.85%

ละลาย NaCl 8.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียม DNS reagent สำหรับวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในกระบวนการ SSF

1. **สารละลาย Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 1% ประกอบด้วย**
   - Dinitrosalicylic acid: 10 g
   - Phenol: 2 g (optional, see Note 1)
   - Sodium sulfite: 0.5 g

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Sodium hydroxide: 10 g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. **สารละลาย Potassium sodium tartrate solution 40%**

ละลาย Potassium sodium tartrate 40 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

1. การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช (Goering and Van Soest, 1970)

1.1 <u>การสกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent</u>

(1) นำ Sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

(2) ชั่งตัวอย่างที่แห้งและบดละเอียดขนาด 20-30 mesh หรือ 1 มิลลิเมตร ประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร

(3) เติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร Sodium sulfite 0.5 กรัม และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร นำไป reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

(4) ถ่ายส่วนผสมที่ reflux เสร็จแล้วลงใน Sintered glass crucible ที่วางอยู่บนชุดกรอง ล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย Acetone 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จนแห้ง จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

(5) นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือปริมาณ Neutral detergent fiber (NDF)

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\%NDF = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 การสกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

(1) นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาถ่ายใส่ในบีกเกอร์เพื่อทำการ Reflux ด้วย Acid detergent โดยเติม Acid detergent 10มิลลิลิตร และ Decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

(2) กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใบเดิม เพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% Ethanol 2 ครั้ง

(3) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF และ ADF คือ น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลส

วิธีคำนวณ

$$\%ADF = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\%\ \text{Hemicellulose} = \%NDF - \%ADF$$

1.3 การวิเคราะห์หา Permanganate lignin (PML)

(1) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย Acid detergent แล้ว แช่ crucible ลงในถาดที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่งแก้วเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที โดยคนเป็นบางครั้ง จากนั้นดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(2) เติมสารละลาย Combined permanganate 25 มิลลิลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้อีก 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกให้หมดโดยใช้ vacuum pump

(3) เติมสารละลาย Demineralizing ลงใน crucible แต่ละถ้วย แช่ไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างพืชเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 80% Ethanol และ acetone แล้วดูดให้แห้งโดยใช้ vacuum pump

(4) นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง Acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของลิกนิน

วิธีคำนวณ

$$\%\text{Lignin} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

โดยที่ A = น้ำหนัก crucible + น้ำหนัก ADF

B = น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก

C = น้ำหนักตัวอย่างพืช

1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่มีตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วในข้อ 1.3 ไปเผาในเครื่องเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการสกัดลิกนินออก และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้าก็คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาเถ้าและน้ำหนัก crucible

วิธีคำนวณ

$$\%\text{ Cellulose} = \frac{(B - D) \times 100}{C}$$

2. การหาปริมาณซัลเฟอร์ในชีวมวลพืช

2.1 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยวิธี Wet digestion (Oweczkin and Kerven, 1980)

(1) ชั่งตัวอย่างพืช 0.1 กรัม ใส่ในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง

(2) เติมกรดไนตริกปริมาตร 10 มิลลิลิตร อุ่นตัวอย่างใน Digestion block ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 130 องศาเซลเซียส ย่อยตัวอย่างต่อจนกรดไนตริกระเหยหมดใช้เวลาประมาณ 90 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลง

(3) เติมกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และย่อยต่อที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส จนเกิดควันขาวในหลอดย่อยแสดงว่ากระบวนการย่อยสมบูรณ์ ใช้เวลาตั้งแต่อุณหภูมิถึง 190 องศาเซลเซียสประมาณ ½-1 ชั่วโมง (แล้วแต่ชนิดของพืช)

(4) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองสารละลายอีกครั้ง จึงจะได้สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่อไป

2.2 <u>การหาปริมาณซัลเฟอร์ด้วยวิธี Turbidimetric determination</u> (Chapman and Pratt, 1961)

(1) ปิเปตสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรดมา 10-20 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) เติม 2 N ammonium acetate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อปรับให้ตัวอย่างมี pH ประมาณ 5

(3) เติมสารละลายอิ่มตัวของ Barium chloride ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 นาที

(4) เติม 0.25% Gum acacia ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

(5) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

(6) เขย่ากลับไปกลับมาหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-30 นาที

(7) ทำ reagent blank โดยใช้ blank ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างด้วยกรดแต่ไม่ใส่พืช แล้วทำต่อไปตามข้อ (1) ถึง (6)

<u>2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์</u>

(1) จากสารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตมา 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

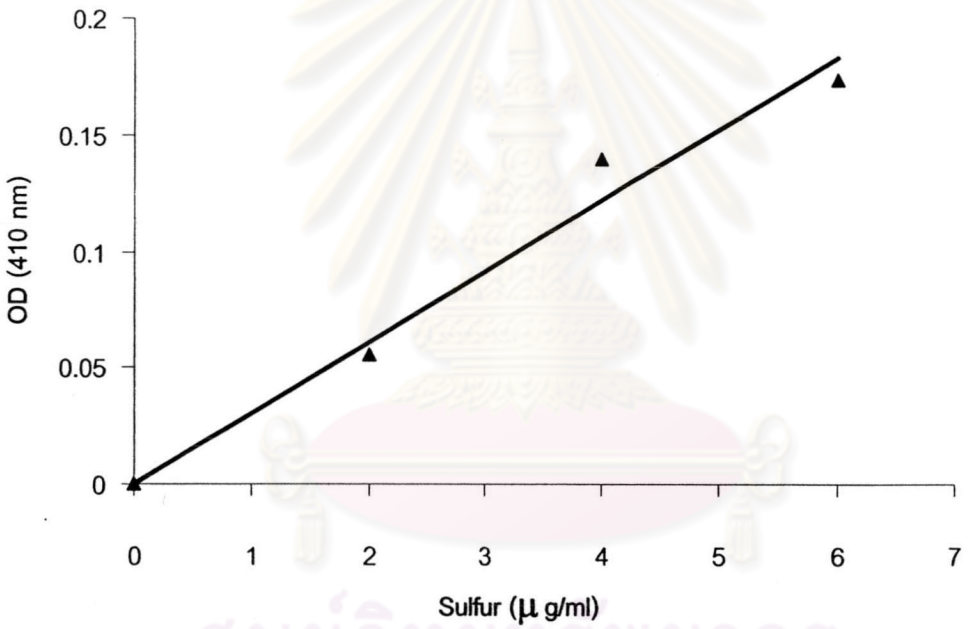
(3) ปิเปตสารละลายในข้อ (2) มา 2 4 และ 6 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำต่อตามข้อ (1) ถึง (6) (ในข้อ 2.2) จะได้สารละลายมาตรฐานซัลเฟอร์ความเข้มข้น 2 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-30 นาที แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซัลเฟอร์และค่าการดูดกลืนแสง

วิธีคำนวณ

นำค่าการการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่แสดงในกราฟมาตรฐานซัลเฟอร์ ดังภาพที่ 34 นำค่าความเข้มข้นที่ได้มาคำนวณหาปริมาณซัลเฟอร์ออกมาเป็น กรัมต่อตัวอย่างพืช 100 กรัม หรือเท่ากับ ปริมาณซัลเฟอร์ในหน่วยเปอร์เซ็นต์ (%) (เทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

$$\text{ปริมาณซัลเฟอร์ (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านได้จากกราฟ x 50 x dilution factor x 100}}{\text{น้ำหนักแห้งตัวอย่าง x } 10^6}$$



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานซัลเฟอร์ โดยใช้ Calcium sulfate เป็นสารละลายมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

1. **การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์** exoglucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, [EC 3.2.1.91]) **ด้วยวิธี** FPU Assay (Ghose, 1987)

วิธีทำ

(1) เติม 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (บางตัวอย่างอาจต้องเจือจางด้วย citrate buffer ก่อน) แล้วใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 1.0 x 6.0 เซนติเมตร (น้ำหนักประมาณ 50 มิลลิกรัม) 1 ชิ้น

(3) นำไปบ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex

(6) เมื่อกระดาษกรองนอนก้นดีแล้ว (หลังจากตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที) นำส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

2. **การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์** endoglucanase (1,4-β-D-glucan 4-glucohydrolase [EC 3.2.1.4]) **ด้วยวิธี** Carboxymethyl Cellulase Assay (Ghose, 1987)

วิธีทำ

(1) เติม 2% Carboxymethyl cellulose (CMC) ที่ละลายใน 0.05 M sodium citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร (เจือจางด้วย citrate buffer ก่อน) เขย่าให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็น

เวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

3. การวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ β-glucosidase (β-D-glucoside glucohydrolase [EC 3.2.1.21]) (Sternberg, Vijaykumar, and Reese, 1977)

วิธีทำ

(1) เติมสารละลาย salicin ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.025 M sodium citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตรอย่างน้อย 25 มิลลิลิตร

(2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) นำไปบ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4) เติมสารละลาย DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น

(5) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

4. การวัดแอคติวิตีของไซแลนเนส (Ghose and Bisaria, 1987)

วิธีทำ

(1) เติมเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

(2) เติม 1% ไซแลน ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ 50 mM phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(4) เติม alkaline copper reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

(5) เติม arsenomolybdate reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(6) เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้ 50 mM phosphate buffer เป็นหลอดควบคุม (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส เพื่อนำค่าน้ำตาลที่ได้ไปคำนวณหาแอคติวิตีของไซแลนเนสจากสูตรตามหลักของ International Unit (IU)

5. การคำนวณหาค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry (Lehninger, 1982)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.180 มิลลิกรัม ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

5.1 การคำนวณแอคติวิตีของเซลลูเลส

ค่าแอคติวิตีของ exoglucanase จะได้ว่า

ถ้ากลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

ถ้ากลูโคส 1.00 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 60 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 60)}$ = 0.093 หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร สามารถปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 60 นาที มีค่าเท่ากับ X x 0.093 หน่วย

ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ในสภาวะเดียวกัน จะมีค่า เท่ากับ $\frac{(X \times 0.093)}{0.5}$ หน่วย

หรือ = $\frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 0.093}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$ หน่วย/มล. (U/ml)

ดังนั้น ค่าแอคติวิตีของ endoglucanase จะได้ว่า

ถ้า กลูโคส 0.180 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

ถ้ากลูโคส 1.00 มิลลิกรัม ที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่า $\frac{1}{(0.180 \times 30)}$ = 0.185 หน่วย

เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร สามารถปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 30 นาที มีค่า

เท่ากับ $X \times 0.185$ หน่วย

ดังนั้น เมื่อใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ในสภาวะเดียวกัน จะมีค่า เท่ากับ $\frac{(X \times 0.185)}{0.5}$ หน่วย

หรือ $= \frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 0.185}{\text{ปริมาตรของเอนไซม์}}$ หน่วย/มล. (U/ml)

สำหรับค่าแอคติวิตีของ β-glucosidase คำนวณเช่นเดียวกันกับค่าแอคติวิตีของ endoglucanase

5.2 การคำนวณแอคติวิตีของไซแลนเนส

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่ใช้ทดสอบ นั่นคือ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 ไมโครโมลของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที

= 1 ไมโครโมลของไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

= 0.150 มิลลิกรัม ของไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.150 มิลลิลิตร ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า $= \frac{1}{0.150 \times 10}$ **หน่วย**

$= 0.67$ **หน่วย**

หากปลดปล่อยไซโลส X มิลลิลิตร ใน 10 นาที จะมีค่า $= (X) \times (0.67)$ **หน่วย**

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร

จะมีค่า $= \frac{(X) \times (0.67)}{0.25}$ **หน่วย**

หรืออาจคิดเป็น $= \frac{(\text{มิลลิกรัมไซโลส}) \times 0.67}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ หน่วยต่อมิลลิลิตร

6. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret Method (Bradford, 1976)

วิธีทำ

(1) เติมเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย Biuret reagent 4 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง) เขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

(2) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเขย่าให้เข้ากันดีด้วยเครื่อง Vortex ก่อนนำไปวัดทันที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีน

7. การหาค่า specific activity

นำค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่คำนวณได้ในหน่วย หน่วยต่อมิลลิลิตร มาหารด้วยค่าปริมาณโปรตีนของเอนไซม์นั้น ค่า specific activity ของเอนไซม์จะมีหน่วยเป็น หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

8. การหาค่า maximum specific growth rate สำหรับเชื้อราที่เจริญเป็น pellet **(Prosser, 1995)**

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลา สามารถหาค่าคงที่ k ได้จากสมการ

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + kt \quad \text{.....(1)}$$

โดยที่ M = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลา t (เวลาที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในช่วง log phase)

M_0 = น้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เวลาเริ่มต้นบ่มเชื้อ

เมื่อทราบค่าคงที่ k แล้ว คำนวณหาค่า w (ความกว้างของชั้นนอกของ pellet ที่เป็นชั้นของ active hyphae) จากสมการ

$$M = M_0 + (4/3\ \pi pn)^{1/3}\ w\mu t \quad \text{.....(2)}$$

โดยที่ p = ค่าคงที่ของความหนาแน่นของ pellet

n = จำนวน pellet

μ = specific growth rate

แทนค่าคงที่ k = $(4/3\ \pi pn)^{1/3}\ \mu t$ ลงในสมการที่ 2

เมื่อทราบค่า w แล้ว คำนวณหาค่า μ ได้จากสมการ

$$r = r_0 + w\mu t \quad \text{.....(3)}$$

โดยที่ r = รัศมีของ pellet ณ เวลา t

r_0 = รัศมีของ pellet ณ เวลาเริ่มบ่มเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. **การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลและโปรตีนสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์**

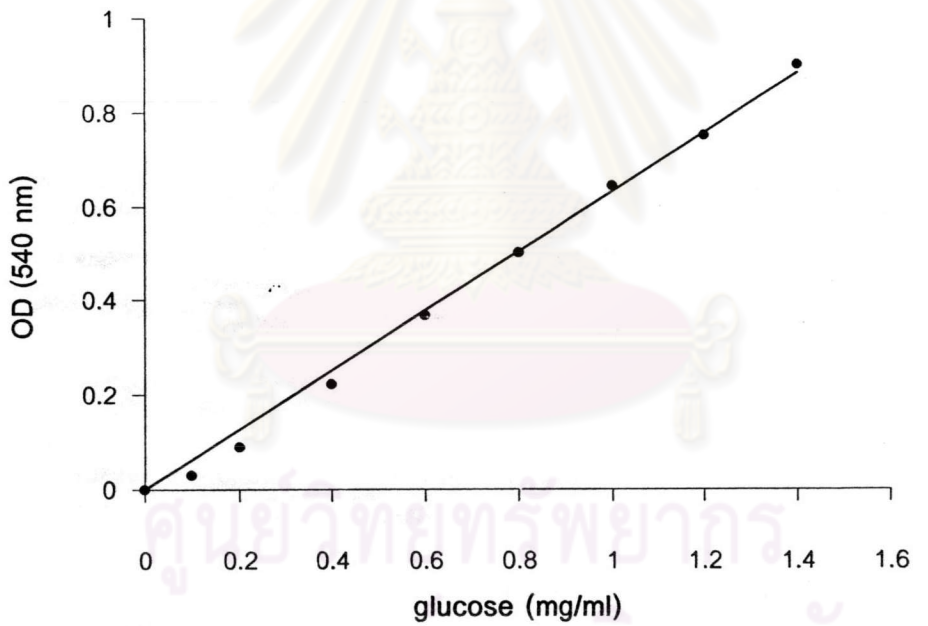
8.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

วิธีทำ

(1) เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย citrate buffer

(3) เติมสารละลาย DNS reagent หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดบน water bath นาน 5 นาที

(4) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำเย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟน้ำตาลมาตรฐานดังภาพที่ 35



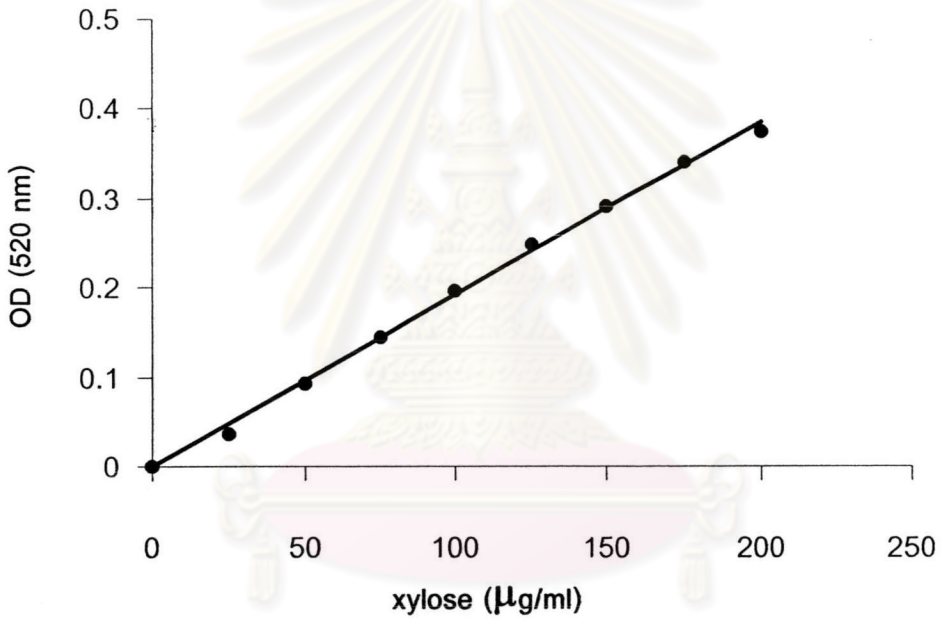
ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ได้จากวิธี DNS assay เพื่อใช้ในการคำนวณแอคติวิตีของเซลลูเลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

วิธีทำ

เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 25 50 75 100 125 150 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม reagent C หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม reagent D หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลสดังแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 36 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

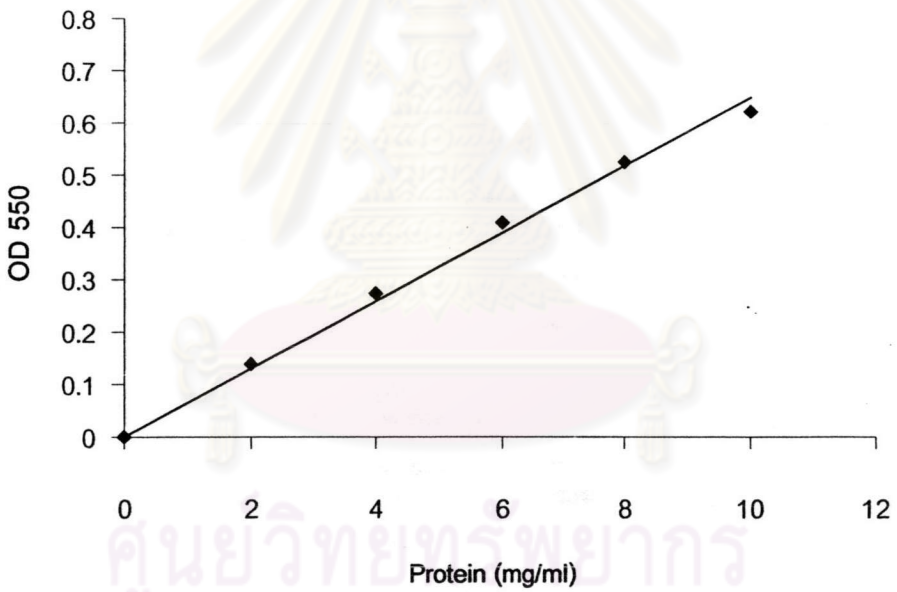
8.3 การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

วิธีทำ

(1) เตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

(2) เติมสารละลาย Biuret reagent ลงไปหลอดละ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

(3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเขย่าให้เข้ากันกันดีด้วยเครื่อง Vortex ก่อนนำไปวัดทันที แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนดังภาพที่ 37

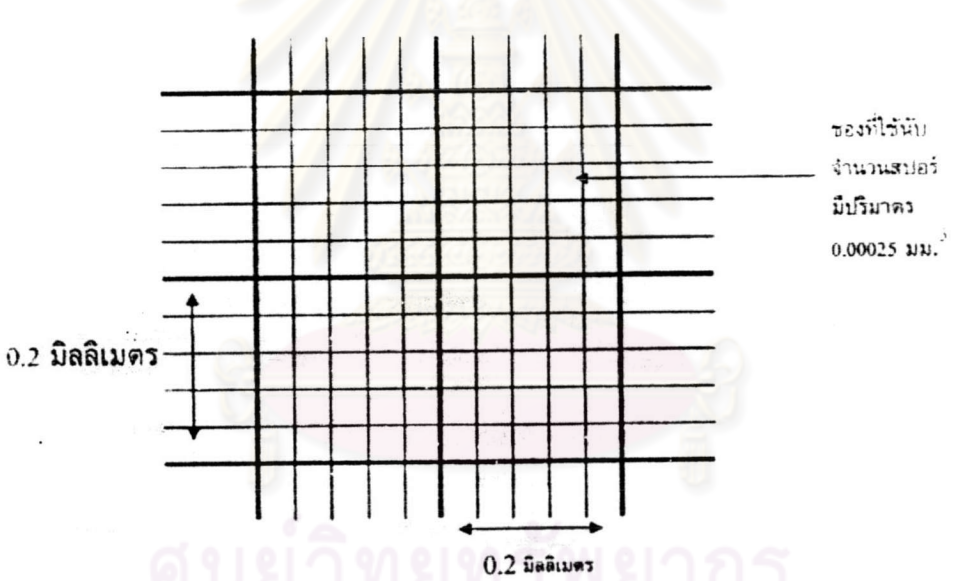


ภาพที่ 37 กราฟมาตรฐานโปรตีน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Biuret method

ภาคผนวก จ

1. **การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี** Direct Microscopic Count **โดยใช้** Haemacytometer

Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ได้ Haemacytometer เป็น สไลด์มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้จะทำให้มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ ขีดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องใหญ่จะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลวที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำ ไม่เจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemacytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้านับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = X เซลล์

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = Y เซลล์

นั่นคือ X = 16Y เซลล์

ดังนั้น

ใน 0.1 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 หรือ Y x 16 x 25 เซลล์

ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 x 10 หรือ Y x 16 x 25 x 10 เซลล์

ใน 1 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 x10 x 1000 หรือ Y x 16 x 25 x 10 x 1000 เซลล์

หรือเท่ากับ $X \times 25 \times 10^4$ หรือ $4Y \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. **การหาค่า maximum specific growth rate สำหรับยีสต์(Walker, 1998)**

ค่า maximum specific growth rate คำนวณได้จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตเทียบกับเวลาจากสูตร

$$\mu_{max} = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

โดยที่ μ_{max} = maximum specific growth rate

x_1 = น้ำหนักแห้งของเซลล์ ณ เวลา t_1 (เวลาที่ให้ค่าน้ำหนักเซลล์สูงสุดในช่วง log phase)

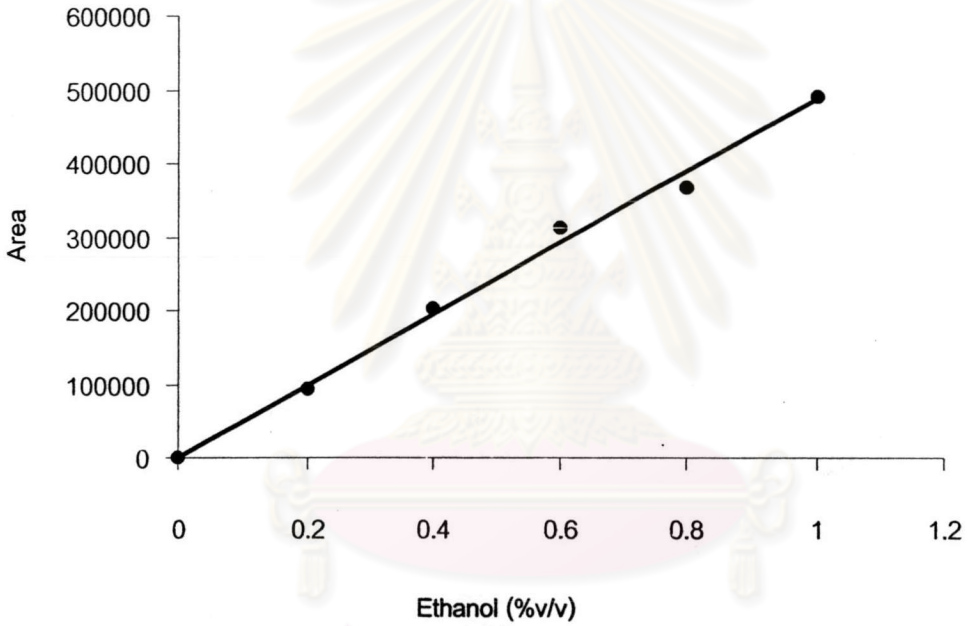
x_0 = น้ำหนักแห้งของเซลล์ ณ เวลา t_0 (เวลาเริ่มต้น)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ

1. การสร้างกราฟมาตรฐานเอทานอล

เตรียมเอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0% (v/v) แล้วนำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ของแต่ความเข้มข้นมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและพื้นที่ใต้กราฟ ดังภาพที่ 38



ภาพที่ 38 กราฟมาตรฐานเอทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก** (Miller,1959)

(1) ปิเปตน้ำหมักที่เจือจางแล้วปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

(2) เติม 1% DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน

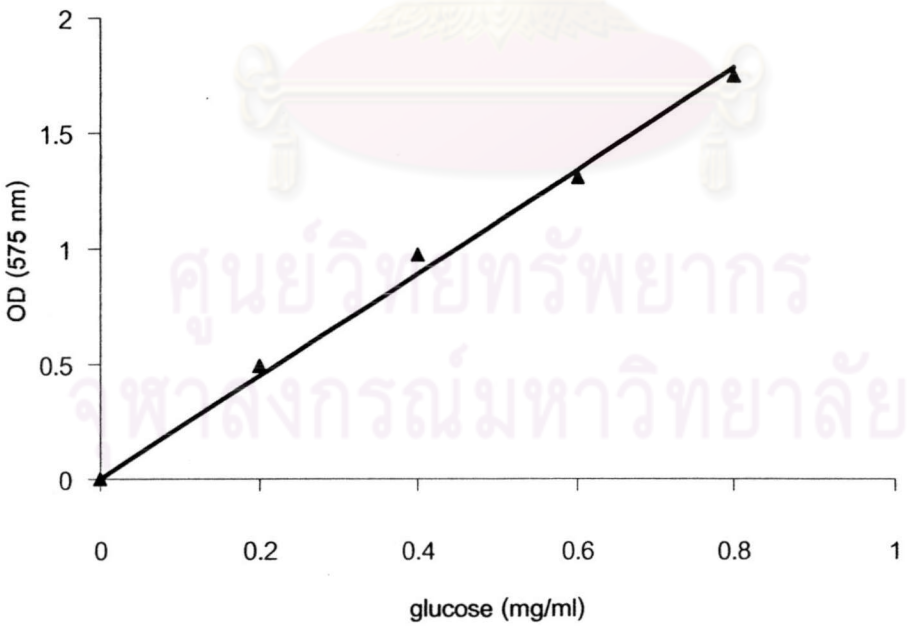
(3) นำไปต้มบน water bath ที่มีน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นยกลงมาวางในอ่างน้ำเย็นเพื่อให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

(4) เมื่อเย็นแล้วเติม 40% Potassium sodium tartate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน

(5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในกราฟมาตรฐานที่ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ออกมาเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ กรัมต่อ100 มิลลิลิตร (%, w/v)

<u>2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน</u>

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำตามวิธีในข้อ 2 (1-4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกลูโคส ดังภาพที่ 39



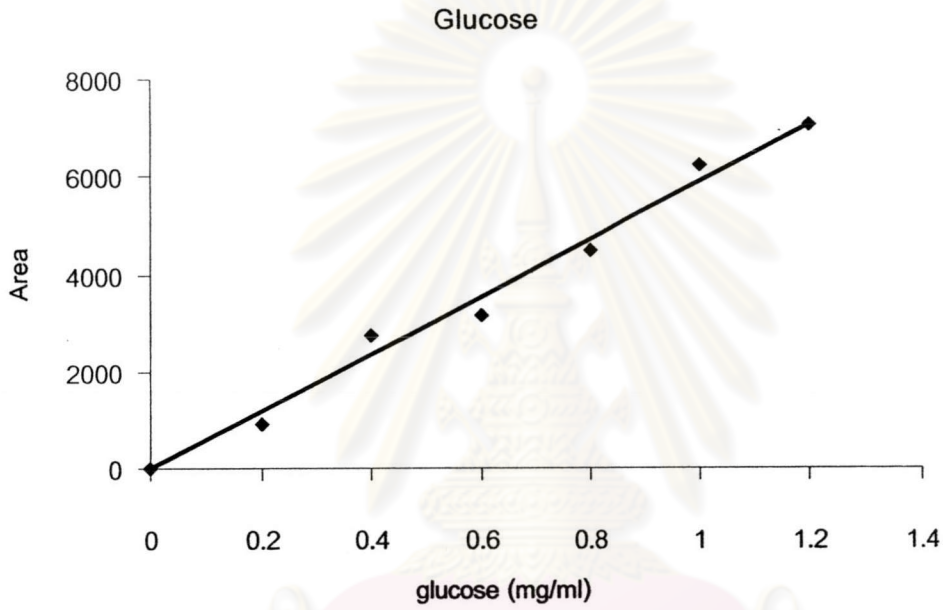
ภาพที่ 39 กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาล (ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC)

3.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสในน้ำกลั่นความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสและพื้นที่ใต้กราฟ ดังภาพที่ 40

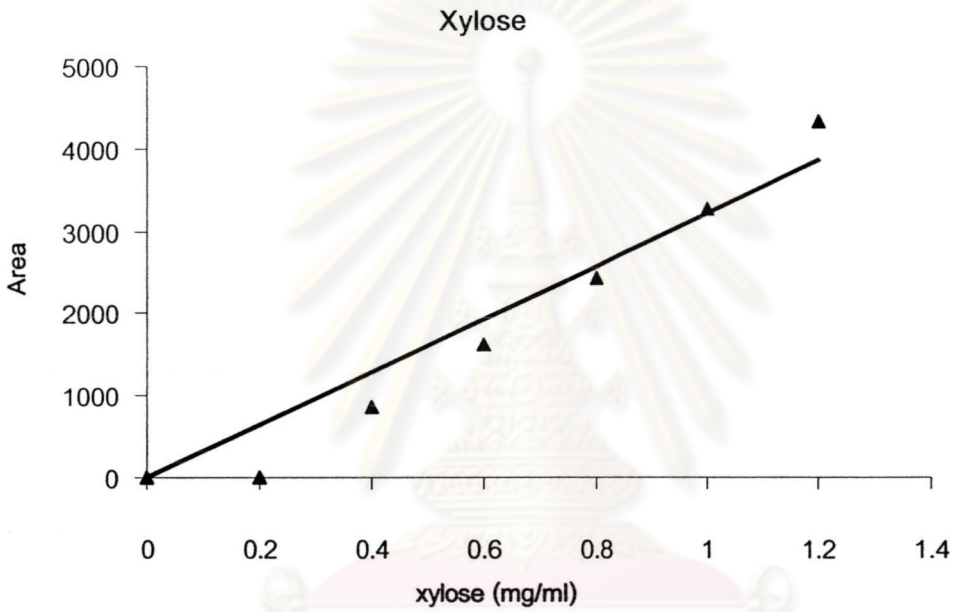


ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานไซโลส

เตรียมสารละลายไซโลสในน้ำกลั่นความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลสและพื้นที่ใต้กราฟ ดังภาพที่ 41

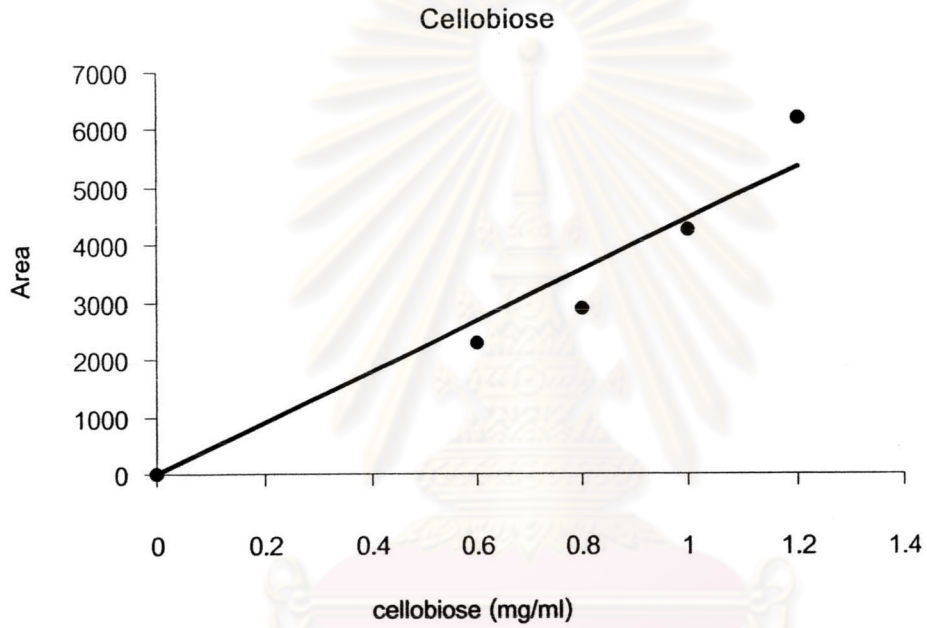


ภาพที่ 41 กราฟมาตรฐานไซโลส ที่ได้จากวัดด้วยเครื่อง HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานเซลโลไบโอส

เตรียมสารละลายเซลโลไบโอสในน้ำกลั่นความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจสอบความเข้มข้นด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลโลไบโอสและพื้นที่ใต้กราฟ ดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 กราฟมาตรฐานเซลโลไบโอส ที่ได้จากวัดด้วยเครื่อง HPLC

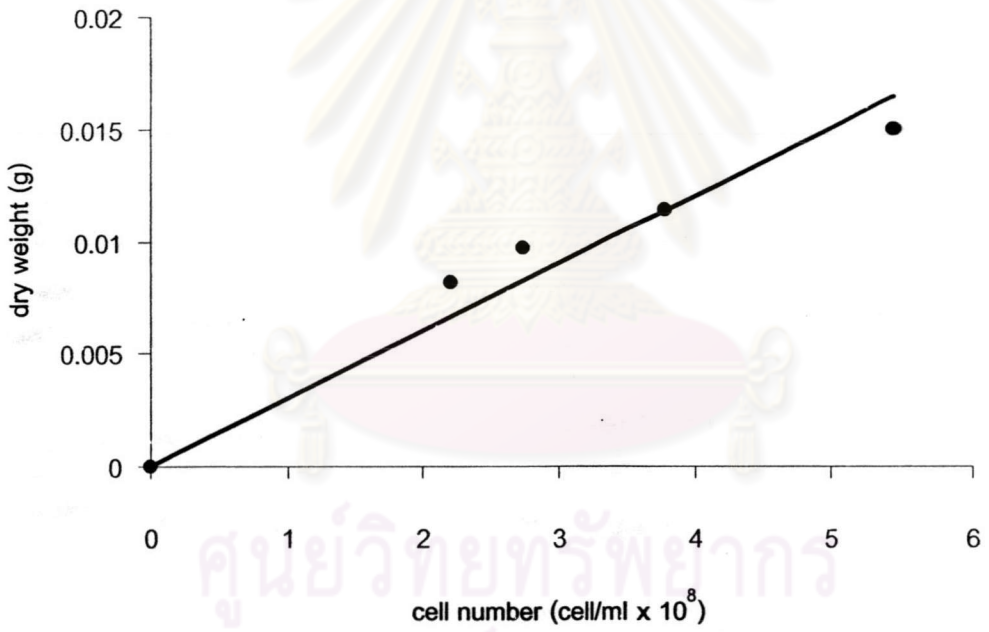
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์ยีสต์

(1) เจือจางเซลล์ยีสต์เข้มข้นด้วย Normal saline เข้มข้น 0.85% ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ต่างๆ กัน นับจำนวนเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นโดยใช้ heamacytometer

(2) ปิเปตเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่ชั่งน้ำหนักแห้งไว้แล้ว แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนักแห้ง เมื่อหักลบน้ำหนักกระดาษกรองออกแล้ว น้ำหนักที่ได้คือน้ำหนักเซลล์ยีสต์

(3) นำค่าน้ำหนักที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล และความเข้มข้นของเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร) ดังภาพที่ 43



ภาพที่ 43 กราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้งของยีสต์ *K. marxianus* NRRL Y-1109 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร YMB

ภาคผนวก ช

ตารางสถิติ

1 = *Coix aquatica*, 2 = *Imperata cylindrica*, 3 = *Panicum maximum*, 4 = *Pennisetum polystachyon*, 5 = *Pennisetum purpureum*, 6 = *Phragmites karka*, 7 = *Saccharum spontaneum*, 8 = *Sorghum propinquum*, 9 = *Thysanolaena maxima*, 10 = *Typha angustifolia*

Ash content (%)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05						
			a	b	c	d	e	f	g
Duncan[a]	7	3	4.9467						
	9	3	5.4667	5.4667					
	2	3		6.2733	6.2733				
	1	3			7.2933	7.2933			
	6	3				7.5333	7.5333		
	3	3				8.1833	8.1833	8.1833	
	4	3					8.4633	8.4633	
	8	3						8.7900	
	5	3							10.1900
	10	3							11.0800
	Sig.		.313	.124	.056	.108	.094	.267	.092

Heating value (MJ/kg, or GJ/t)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	10	3	16.4100			
	1	3	16.6100	16.6100		
	5	3		16.7000		
	3	3		16.7900		
	8	3		16.8200		
	4	3		16.8400		
	6	3			17.2900	
	7	3			17.4300	
	2	3			17.4700	
	9	3				18.7900
	Sig.		.098	.087	.154	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Sulfur (% dry weight basis)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05							
			a	b	c	d	e	f	g	h
Duncan[a]	3	3	6.20E-02							
	8	3	8.47E-02	8.47E-02						
	2	3	9.17E-02	9.17E-02						
	9	3		.11933						
	7	3			.23533					
	1	3				.76733				
	5	3					1.09167			
	10	3						1.19633		
	4	3							1.26033	
	6	3								1.53700
	Sig.		.114	.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ก่อน Pretreatment (% cellulose)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	10	3	32.0333					
	1	3	33.1533	33.1533				
	8	3	33.8033	33.8033				
	5	3		34.5967				
	2	3			37.2100			
	6	3			37.8300	37.8300		
	4	3			38.6933	38.6933	38.6933	
	3	3				39.3900	39.3900	
	9	3					39.8067	
	7	3						42.2333
	Sig.		.059	.119	.109	.093	.225	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก่อน Pretreatment (% hemicellulose)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	9	3	26.7133		
	4	3	27.4567		
	10	3	27.6600		
	3	3	28.3100		
	5	3	28.4467		
	6	3		30.5200	
	8	3		30.7967	
	7	3		31.9067	
	2	3		32.2300	
	1	3			34.2100
	Sig.		.082	.080	1.000

ก่อน Pretreatment (% lignin)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	1	3	6.0033			
	5	3	6.8367	6.8367		
	8	3		8.1467		
	2	3		8.2067		
	7	3		8.3033		
	10	3			10.2167	
	4	3			10.5567	
	3	3			10.6500	
	6	3			11.0333	
	9	3				14.4367
	Sig.		.276	.084	.327	1.000

หลัง Pretreatment (% cellulose)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05						
			a	b	c	d	e	f	g
Duncan[a]	10	3	55.2967						
	9	3		60.4800					
	6	3			64.4833				
	1	3			64.5300				
	8	3				65.4800			
	7	3					67.3233		
	5	3					67.7100	67.7100	
	2	3					67.7900	67.7900	
	3	3						68.2700	
	4	3							71.1700
	Sig.		1.000	1.000	.874	1.000	.144	.083	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลัง Pretreatment (% hemicellulose)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[a]	4	3	10.1000				
	3	3		11.9833			
	6	3			13.1267		
	1	3			13.8567		
	10	3			14.0933		
	8	3			14.1133		
	7	3				15.2367	
	5	3				15.8467	
	2	3				15.8967	
	9	3					17.3833
	Sig.		1.000	1.000	.089	.234	1.000

หลัง Pretreatment (% lignin)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	1	3	4.3167					
	8	3		6.4933				
	5	3			8.0900			
	2	3			8.1033			
	7	3			8.2933			
	4	3				9.7267		
	3	3					10.4300	
	10	3						11.8233
	6	3						12.3867
	9	3						12.4300
	Sig.		1.000	1.000	0.528	1.000	1.000	.067

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Moisture content at harvest (%)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	7	3	58.8400					
	6	3		66.5600				
	2	3		68.3467	68.3467			
	4	3		70.5067	70.5067	70.5067		
	8	3			72.5667	72.5667	72.5667	
	9	3			73.1167	73.1167	73.1167	
	3	3				74.1600	74.1600	
	5	3					77.4467	
	10	3						90.1700
	1	3						91.0933
	Sig.		1.000	.101	.057	.139	.051	.676

Dry weight (kg/m^2)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	2	3	.6067			
	1	3	.6600			
	10	3	.8667	.8667		
	4	3	1.0000	1.0000		
	8	3	1.3367	1.3367		
	6	3	1.4600	1.4600		
	3	3	1.5600	1.5600		
	7	3		1.9700	1.9700	
	9	3			2.9600	2.9600
	5	3				3.3267
	Sig.		.092	.051	.050	.449

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปรียบเทียบเอทานอลสูงสุดที่ได้จากวัชพืชแต่ละชนิด (g/100 ml)

	Weed species	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[a]	9	3	.1367				
	2	3	.1633	.1633			
	6	3	.1733	.1733			
	3	3		.2133			
	5	3		.2300	.2300		
	10	3			.2800	.2800	
	8	3				.3033	
	4	3				.3333	
	7	3				.3367	
	1	3					.4900
	Sig.		.258	.052	.109	.095	1.000

Yeast cell (*C. aquqtica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[c]	0	6	.3783		
	3	6		2.7750	
	5	6		2.8833	
	7	6			3.4417
	Sig.		1.000	.630	1.000

Yeast cell (*I. cylindrica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.2933	
	3	6		4.4167
	5	6		4.5667
	7	6		4.8083
	Sig.		1.000	.252

Yeast cell (*P. maximum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[c]	0	6	.2962		
	3	6		4.4583	
	5	6		4.6250	
	7	6			6.2667
	Sig.		1.000	.806	1.000

Yeast cell (*P. polystachyon*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.1700	
	3	6		4.2750
	5	6		4.5167
	7	6		4.5833
	Sig.		1.000	.223

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Yeast cell (*P. purpureum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.3000	
	3	6		3.7500
	5	6		3.8583
	7	6		3.8750
	Sig.		1.000	.710

Yeast cell (*P. karka*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.4317	
	3	6		3.4417
	5	6		3.5750
	7	6		3.9417
	Sig.		1.000	.069

Yeast cell (*S. propinquum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[c]	0	6	.1667		
	3	6		2.7167	
	5	6			4.6333
	7	6			4.9417
	Sig.		1.000	1.000	.293

Yeast cell (*S. spontaneum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.3933	
	3	6		4.1000
	5	6		4.3333
	7	6		4.3417
	Sig.		1.000	.557

Yeast cell (*T. angustifolia*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[c]	0	6	.2392		
	3	6		4.4083	
	5	6			5.2500
	7	6			5.2917
	Sig.		1.000	1.000	.918

Yeast cell (*T. maxima*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[c]	0	6	.1750	
	3	6		4.0583
	5	6		4.1000
	7	6		4.5083
	Sig.		1.000	.159

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

c. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

Reducing sugar (*C. aquqtica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	0	9	9.44E-02		
	3	9		.24478	
	5	9			.29222
	7	9			.30356
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Reducing sugar (*I. cylindrica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	0	9	7.77E-02			
	3	9		.17033		
	5	9			.21478	
	7	9				.26989
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reducing sugar (*P. maximum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	0	9	6.09E-02	
	3	9		.20956
	5	9		.23378
	7	9		.23589
	Sig.		1.000	.052

Reducing sugar (*P. polystachyon*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	0	9	5.71E-02	
	3	9		.20011
	5	9		.20233
	7	9		.20844
	Sig.		1.000	.089

Reducing sugar (*P. purpureum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	0	9	8.91E-02			
	3	9		.20689		
	5	9			.29211	
	7	9				.36211
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Reducing sugar (*P. karka*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	0	9	.12533			
	3	9		.26789		
	5	9			.29667	
	7	9				.36722
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Reducing sugar (*S. propinquum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	0	9	6.03E-02		
	3	9		.26789	
	5	9		.27189	.27189
	7	9			.27922
	Sig.		1.000	.336	.083

Reducing sugar (*S. spontaneum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	0	9	.13233			
	3	9		.26467		
	5	9			.31011	
	7	9				.35100
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Reducing sugar (*T. maxima*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	0	9	.11456		
	3	9		.19811	
	5	9		.20733	
	7	9			.23344
	Sig.		1.000	.322	1.000

Reducing sugar (*T. angustifolia*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	0	9	9.96E-02		
	3	9		.20856	
	5	9		.23433	
	7	9			.29856
	Sig.		1.000	.075	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

b. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000

Residues (*C. aquqtica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	7	3	.2982		
	5	3	.4685	.4685	
	3	3		.5133	
	0	3			3.0000
	Sig.		.066	.591	1.000

Residues (*I. cylindrica*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	5	3	.9079		
	7	3	.9328		
	3	3		1.2236	
	0	3			3.0000
	Sig.		.682	1.000	1.000

Residues (*P. maximum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[a]	5	3	.3496			
	7	3		.9045		
	3	3			1.3124	
	0	3				3.0000
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Residues (*P. polystachyon*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	7	3	.8460		
	5	3	1.0406	1.0406	
	3	3		1.2664	
	0	3			3.0000
	Sig.		.115	.074	1.000

Residues (*P. purpureum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	7	3	1.0229		
	5	3	1.1732		
	3	3		1.4564	
	0	3			3.0000
	Sig.		.119	1.000	1.000

Residues (*P. karka*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	7	3	1.7090	
	5	3	1.7123	
	3	3	1.7728	
	0	3		3.0000
	Sig.		.170	1.000

Residues (*S. spontaneum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	3	3	1.2101	
	7	3	1.2390	
	5	3	1.2441	
	0	3		3.0000
	Sig.		.566	1.000

Residues (*S. propinquum*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	5	3	.2726		
	7	3	.3881		
	3	3		1.4518	
	0	3			3.0000
	Sig.		.101	1.000	1.000

Residues (*T. maxima*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	7	3	1.1930		
	5	3	1.2957	1.2957	
	3	3		1.4165	
	0	3			3.0000
	Sig.		.143	.093	1.000

Residues (*T. angustifolia*)

	Day (S)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[a]	5	3	.6939		
	7	3	.7921		
	3	3		1.2709	
	0	3			3.0000
	Sig.		.439	1.000	1.000

pH 3 days

	Weed species	N	Uses Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	2	3	3.9100					
	3	3		3.9833				
	1	3			4.0700			
	4	3			4.0800			
	5	3			4.0867	4.0867		
	7	3			4.0933	4.0933		
	6	3			4.1233	4.1233	4.1233	
	8	3				4.1600	4.1600	
	9	3					4.1700	
	10	3						4.2967
	Sig.		1.000	1.000	.166	.056	.201	1.000

pH 5 days

	Weed species	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[a]	2	3	3.9033					
	5	3		3.9967				
	1	3		4.0600	4.0600			
	6	3			4.1000	4.1000		
	7	3			4.1000	4.1000		
	4	3			4.1500	4.1500		
	3	3				4.1833	4.1833	
	8	3					4.2433	4.2433
	9	3					4.2633	4.2633
	10	3						4.3267
	Sig.		1.000	.134	.054	.056	.075	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

pH 7 days

	Weed species	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[a]	2	3	3.9100				
	5	3	3.9867	3.9867			
	7	3		4.0933	4.0933		
	6	3			4.1433		
	1	3			4.1700	4.1700	
	3	3				4.2600	4.2600
	4	3					4.2933
	9	3					4.3267
	10	3					4.3733
	8	3					4.3767
	Sig.		.164	.058	.186	.105	.060

Acrophialophora sp. wild type (exoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	3	9	1.00E-02				
	6	9		3.51E-02			
	9	9			5.72E-02		
	12	9				8.60E-02	
	15	9					9.78E-02
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Acrophialophora sp. UV 10-2 (exoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	3	9	2.56E-02				
	6	9		.12144			
	9	9			.30922		
	12	9				.39333	
	15	9					.61256
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acrophialophora sp. UV 10-7 (exoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	3	9	1.07E-02			
	6	9		3.94E-02		
	9	9		5.86E-02		
	12	9			2.1522	
	15	9				.33411
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Exoglucanase (3 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	1.00E-02	
	UV 10-2	9	1.07E-02	
	UV 10-7	9		2.56E-02
	Sig.		.687	1.000

Exoglucanase (6 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	3.51E-02	
	UV 10-2	9	3.94E-02	
	UV 10-7	9		.12144
	Sig.		.164	1.000

Exoglucanase (9 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	5.72E-02	
	UV 10-2	9	5.86E-02	
	UV 10-7	9		.30922
	Sig.		.838	1.000

Exoglucanase (12 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	8.60E-02		
	UV 10-2	9		.21522	
	UV 10-7	9			.39333
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Exoglucanase (15 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	9.78E-02		
	UV 10-2	9		.33411	
	UV 10-7	9			.61256
	Sig.		1.000	1.000	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acrophialophora sp. wild type (endoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	3	9	.10600				
	6	9		.32344			
	9	9			.90900		
	12	9				1.45433	
	15	9					1.73722
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Acrophialophora sp. UV 10-2 (endoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	3	9	.17789				
	6	9		1.11833			
	9	9			1.91044		
	12	9				2.57711	
	15	9					3.83333
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Acrophialophora sp. UV 10-7 (endoglucanase)

	days	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	3	9	9.99E-02				
	6	9		.69822			
	9	9			1.32978		
	12	9				2.38000	
	15	9					3.72356
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Endoglucanase (3 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	9.99E-02	
	UV 10-2	9	.1060	
	UV 10-7	9		.1779
	Sig.		.276	1.000

Endoglucanase (6 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	.3234		
	UV 10-2	9		.6982	
	UV 10-7	9			1.1183
	Sig.		1.000	1.000	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Endoglucanase (9 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	.9090		
	UV 10-2	9		1.3298	
	UV 10-7	9			1.9104
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Endoglucanase (12 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	1.4543		
	UV 10-2	9		2.3800	
	UV 10-7	9			2.5771
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Endoglucanase (15 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	1.73722	
	UV 10-2	9		3.72356
	UV 10-7	9		3.83333
	Sig.		1.000	.118

Acrophialophora sp. wild type (ß – glucosidase)

	days	N	Subset for alpha = .05			
			a	b	c	d
Duncan[b]	3	9	3.22E-02			
	6	9	5.33E-02	5.33E-02		
	9	9		7.56E-02	7.56E-03	
	12	9			1.00E-02	1.00E-02
	15	9				1.20E-02
	Sig.		.094	.078	.054	.111

Acrophialophora sp. UV 10-2 (ß – glucosidase)

	days	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	3	9	2.00E-02	
	6	9	2.04E-02	
	9	9	2.12E-02	
	12	9	3.82E-02	
	15	9		8.41E-02
	Sig.		.073	1.000

Acrophialophora sp. UV 10-7 (ß – glucosidase)

	days	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	3	9	1.24E-02	
	6	9	2.38E-02	
	9	9	2.96E-02	
	12	9	3.43E-02	
	15	9		8.87E-02
	Sig.		.056	1.000

ß – glucosidase (3 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	5.33E-03		
	UV 10-2	9		1.24E-02	
	UV 10-7	9			2.00E-02
	Sig.		1.000	1.000	1.000

ß – glucosidase (6 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	1.20E-02	
	UV 10-2	9		2.96E-02
	UV 10-7	9		3.82E-02
	Sig.		1.000	.264

ß – glucosidase (9 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	1.00E-02	
	UV 10-2	9		2.04E-02
	UV 10-7	9		2.38E-02
	Sig.		1.000	.342

ß – glucosidase (12 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	wild type	9	7.56E-03		
	UV 10-2	9		2.12E-02	
	UV 10-7	9			3.43E-02
	Sig.		1.000	1.000	1.000

ß – glucosidase (15 days)

	strains	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	wild type	9	3.22E-03	
	UV 10-2	9		8.41E-02
	UV 10-7	9		8.87E-02
	Sig.		1.000	.755

ปริมาณเอทานอล (กรัม/กรัม) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1 day

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3900	
	10^{8}	3	.4000	
	10^{9}	3		.5000
	Sig.		.506	1.000

2 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.4067	
	10^{8}	3	.4200	
	10^{9}	3		.4967
	Sig.		.238	1.000

3 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3900	
	10^{8}	3	.4100	
	10^{9}	3		.4667
	Sig.		.289	1.000

4 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.4067	
	10^{8}	3	.4133	
	10^{9}	3		.4733
	Sig.		.743	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3867	
	10^{8}	3	.4000	
	10^{9}	3		.4733
	Sig.		.457	1.000

6 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3667	
	10^{8}	3	.4167	
	10^{9}	3		.4900
	Sig.		.054	1.000

7 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3900	
	10^{8}	3	.4067	
	10^{9}	3		.4933
	Sig.		.153	1.000

ปริมาณเอทานอล (กรัม/กรัม) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

1 day

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{8}	3	.1767	
	10^{10}	3		.3967
	10^{9}	3		.4900
	Sig.		1.000	.182

2 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{8}	3	.2700	
	10^{10}	3	.3600	.3600
	10^{9}	3		.4467
	Sig.		.101	.112

3 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b	c
Duncan[a]	10^{8}	3	.2267		
	10^{10}	3		.3400	
	10^{9}	3			.4800
	Sig.		1.000	1.000	1.000

4 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a
Duncan[a]	10^{10}	3	.2633
	10^{8}	3	.2800
	10^{9}	3	.4167
	Sig.		.053

5 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{10}	3	.3500	
	10^{8}	3	.3800	.3800
	10^{9}	3		.4767
	Sig.		.514	.067

6 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b
Duncan[a]	10^{8}	3	.2500	
	10^{10}	3	.3167	.3167
	10^{9}	3		.4333
	Sig.		.229	.058

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7 days

	Cell number (cells/ml)	N	Subset for alpha = .05 a	b	c
Duncan[a]	10^8	3	.2367		
	10^{10}	3		.3500	
	10^9	3			.4867
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Yeast cell number

40 degree 1 = 10^8, 2 = 10^9, 3 = 10^{10}

45 degree 4 = 10^8, 5 = 10^9, 6 = 10^{10}

1 day

	Cell number	N	Subset for alpha = .05 a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.2067				
	1	6		.9167			
	5	6			1.4250		
	2	6				2.2667	
	6	6					5.1250
	3	6					5.4917
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.084

2 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05 a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.5017				
	1	6		1.1417			
	5	6			1.7167		
	2	6			1.9917		
	6	6				5.0250	
	3	6					5.5667
	Sig.		1.000	1.000	.286	1.000	1.000

3 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05 a	b	c	d
Duncan[c]	4	6	.3633			
	1	6		1.0000		
	5	6		1.3583	1.3583	
	2	6			1.9167	
	6	6				5.6250
	3	6				5.7667
	Sig.		1.000	.202	.051	.610

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.4817				
	1	6	.8833				
	5	6		1.4833			
	2	6			2.1083		
	6	6				5.3083	
	3	6					5.9250
	Sig.		.125	1.000	1.000	1.000	1.000

5 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.7400				
	1	6	1.0250				
	5	6		1.6500			
	2	6			2.4000		
	6	6				5.0250	
	3	6					6.2083
	Sig.		.268	1.000	1.000	1.000	1.000

6 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.4217				
	1	6		1.0667			
	5	6		1.4750			
	2	6			2.4000		
	6	6				5.0250	
	3	6					6.4833
	Sig.		1.000	.067	1.000	1.000	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7 days

	Cell number	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[c]	4	6	.4183				
	1	6		1.4417			
	5	6		1.7500	1.7500		
	2	6			2.1500		
	6	6				5.3333	
	3	6					6.1000
	Sig.		1.000	.240	.130	1.000	1.000

Reducing sugar (40 °C) 10^8 cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05		
			a	b	c
Duncan[b]	2	9	.3533		
	7	9	.3689		
	3	9	.3700		
	4	9	.3700		
	5	9	.3711		
	6	9	.3756		
	1	9		.4067	
	0	9			5.0000
	Sig.		.207	1.000	1.000

Reducing sugar (40 °C) 10^{10} cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	3	9	.2989	
	4	9	.3156	
	6	9	.3167	
	5	9	.3222	
	2	9	.3356	
	7	9	.3422	
	1	9	.3478	
	0	9		5.0000
	Sig.		.084	1.000

Reducing sugar (40 °C) 10^9 cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	1	9	.2956				
	4	9		.3456			
	2	9		.3522	.3522		
	3	9		.3522	.3522		
	7	9			.3633	.3633	
	6	9			.3633	.3633	
	5	9				.3689	
	0	9					5.000
	Sig.		1.000	.377	.155	.462	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reducing sugar (40 °C)

1 day

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^9	9	.2956	
	10^{10}	9	.3478	
	10^8	9		.4067
	Sig.		.076	1.000

2 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05
			a
Duncan[b]	10^{10}	9	.3356
	10^9	9	.3522
	10^8	9	.3533
	Sig.		.104

3 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.2989	
	10^9	9		.3522
	10^8	9		.3700
	Sig.		1.000	.221

4 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3156	
	10^9	9	.3456	.3456
	10^8	9		.3700
	Sig.		.075	.142

5 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3222	
	10^9	9		.3689
	10^8	9		.3711
	Sig.		1.000	.891

6 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3167	
	10^9	9		.3633
	10^8	9		.3756
	Sig.		1.000	.378

7 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05
			a
Duncan[b]	10^{10}	9	.3422
	10^9	9	.3633
	10^8	9	.3689
	Sig.		.114

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reducing sugar (45 °C) 10^8 cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05				
			a	b	c	d	e
Duncan[b]	5	9	2.0611				
	4	9		2.9767			
	2	9		3.1078	3.1078		
	7	9		3.2689	3.2689	3.2689	
	6	9		3.3689	3.3689	3.3689	
	1	9			3.7744	3.7744	
	3	9				3.8733	
	0	9					5.000
	Sig.		1.000	.273	.061	.090	1.000

Reducing sugar (45 °C) 10^9 cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05					
			a	b	c	d	e	f
Duncan[b]	6	9	.3322					
	4	9		.3611				
	1	9		.3644				
	7	9			.3978			
	5	9			.4100			
	2	9				.4344		
	3	9					.6044	
	0	9						5.0000
	Sig.		1.000	.785	.319	1.000	1.000	1.000

Reducing sugar (45 °C) 10^{10} cell/ml

	Day (s)	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	5	9	.3044	
	6	9	.3078	
	2	9	.3089	
	4	9	.3100	
	3	9	.3111	
	1	9	.3222	
	7	9	.3344	
	0	9		5.0000
	Sig.		.054	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Reducing sugar (45 °C)

1 day

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3222	
	10^{9}	9	.3644	
	10^{8}	9		3.7744
	Sig.		.816	1.000

2 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3089	
	10^{9}	9	.4344	
	10^{8}	9		3.1078
	Sig.		.541	1.000

3 days4 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3111	
	10^{9}	9	.6044	
	10^{8}	9		3.8733
	Sig.		.170	1.000

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3100	
	10^{9}	9	.3611	
	10^{8}	9		2.9767
	Sig.		.736	1.000

5 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3044	
	10^{9}	9	.4100	
	10^{8}	9		2.1611
	Sig.		.571	1.000

6 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3078	
	10^{9}	9	.3322	
	10^{8}	9		3.3689
	Sig.		.928	1.000

7 days

	Cell/ml	N	Subset for alpha = .05	
			a	b
Duncan[b]	10^{10}	9	.3344	
	10^{9}	9	.3978	
	10^{8}	9		3.2689
	Sig.		.731	1.000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภาภรณ์ โสภณพัฒนะโภคา เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม 2521 ที่จังหวัดนครปฐม จบการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนสุพิทยานุกูลในปี 2532 และระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนนาคประสิทธิ์ในปี 2538 จากนั้นได้ศึกษาต่อที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในระดับปริญญาบัณฑิตทางด้านพฤกษศาสตร์ โดยได้รับทุนการศึกษาจากโครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) และสำเร็จการศึกษาเมื่อปี 2542 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตทางด้าน พฤกษศาสตร์ เน้นทางเทคโนโลยีชีวภาพของพืช พร้อมกับได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมและอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานคณะกรรมการนโยบายพลังงานแห่งชาติ (สพช.) และสำเร็จการศึกษาในภาคต้น ปีการศึกษา 2546

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย