รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กาเนิต สุภัณวงศ์. 2534. จุลชีวอุตสาหกรรม. หน้า 225-237. ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ณรงค์ เพ็งปรีชา. 2521. มันสำปะหลัง: วัสดุเส้นใยใหม่. หน้า 12. กองวิจัยผลผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ปิ่น-ฉวี เวชชานุเคราะห์. 2526. จุลินทรีย์และการผลิตชีวก๊าซจากพืช. รายงานการสัมมนาเรื่อง พืชพลังงานและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2524. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เกษตร. หน้า 48-50. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พูนสุข อัตถะสัมปุณณะ. 2533. เชื้อเพลิงเอทธานอลจากวัสดุการเกษตร. วารสารน้ำตาล. 6 (1) : 5-10.

รำไพ ศิริมนกุล. 2534. แอลกอฮอล์. เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. หน้า 440-446. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. 163 หน้า. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

_____., ณัฐศิษฎิ ไทยตระกูล และ ปราโมทย์ ธรรมวัตร. 2531. ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อเชื้อยีสต์และแบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล. รายงานการวิจัย.

ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และ อัฉรา พยัฆพานนท์. 2626. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและการเปลี่ยนชานอ้อยให้เป็นน้ำตาลเพื่อการหมักแอลกอฮอล์. หน้า 6-13. รายงานผลการทดลอง. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เล่ม 2.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2530. การใช้แอลกอฮอล์เพื่อเป็นเชื้อเพลิง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย : วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา. 2 (2) : 51.

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์. 2532. เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาบ่ฏิบัติการ Industrial Botany. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อารีย ชูวิสิฐกุล. 2535. ข้าวโพดและการใช้ประโยชน์ของข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์. สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย 46 (3).

อิทธิฤทธิ์ อึ้งวิเชียร. 2531. ข้าวฟ่างและพลังงาน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย. 3 (3).

ภาษาอังกฤษ

Abadallah, M. H., and Moahanmmed, H. A. 1991. Energy potential from economically avaliable crop residues in Sudan. Energy. 16 (8) : 1153-1156.

Acebal, C., and others. Enchanced cellulase production from Trichoderma reesei QM 9414 on physically treated wheat straw. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 218-223.

Ackerson, M., Ziobro, M., and Gaddy, J. L. 1981. Two-stage acid hydrolysis of biomass. In D. S. Charles. (ed.), Third symposium on biotechnology in energy production and conversion, pp: 103-122. New York : John Wiley & Son.

Aditya, J., Gary, S. K., and Verma, J. 1990. Production of ethanol from sugar in wood hydrolysis by Fusarium oxysporum. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 6: 10-14.

Albert Sa sson. 1988. Biotechnologies and Development. pp. 243-253. Mayenne, France : Imprimerine de la Manutention.

Amore ' D. T., Panchal, C. T., and Stewart GG. 1988. Intra cellular ethanol accumulation in Saccharomyces cerevisiae during fermentation. Appl. Microbiol. 51 (1) : 110-114.

Arauji, A., and Souza' D. T. 1981. Production of biomass from enzymatic hydrolysate of agriculture waste. J. Ferment. Technol. 58 (4) : 339-401.

Ban-Koffi, L., and Han, Y. M. 1990. Alcohol production from pineapple waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 6 (3) : 281-284.

Bellamy, W. D., Schencetaly, N. Y. 1987. (USA) : Herstellung von Ethanol aus Cellulase, D. O. S. p. 2, 808, 932.

Bertolini, M. C., Ernandes, J. R., and Laluce, C., 1991. New yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. Biotechnology Letter. 13 (3) : 197-202.

Barbel Hahn-Hagerdal, Sissi Berner and Kerstin Skoog. 1986. Improve ethanol production from xylose isomerase and Saccharomyces cerevisiae using the respiratory inhibitorazide. Appl. Microbiology and Biotechnology. 24 : 287-293.

Colin Ratledge, 1977. Fermentation substrates. Annual Report on Fermentation Process, pp. 45-56. New York : Academic Press.

Choughlan, M. P. 1989. Enzyme System for Lignocellulose Degradation. New York : Elsevier Applied Science.

Chowdhury, N. A., Moniruzzaman, M., Nahar, N., and Chowdhury, N. 1991. Production of cellulase and saccharification of lignocellulose by A Micromospory sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7 : 603-606.

Dhillon, G. S., Grewal, S. K., Singh, A., and Kalra. M. S. 1988. Production of sugar from rice straw. ACTA. Microbiol. Pol. 37 (2) : 167-173.

Douglas, L. J. 1984. Conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Michael, Z.(ed.), Energy Application of Biomass. pp. 219-230. New York : Elsevier Applied Science Pubishers.

Downing, K. M., Chester, S. HO., and Zabrikiet, D. W. 1987. Enzymatic production of ethanol from cellulase using soluble acetate as an intermidiate. Biotechnology and Bioengineering. 29 : 1086-1096.

Drazic, M., and Nozinic, 'R. 1984. Saccharification of corn cobs using mixed enzyme system. Third European Congrese on Biotechnology. pp. 87-91, Germany : Verlag Chemic.

Dwived, C. D., and Ghose, T. K. 1979. A model on hydrolysis of bagasse cellulase by enzyme from Trichoderm reesei QM 9414. J. Ferment. Technol. 15 (1) : 15-24.

Elshafei, A. M., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C. and Grddy, J. L. 1990. Cellulase and hemicellulase formation by fungi using corn stover as the substrate. BIOL. WASTES. 32 (3) : 209-218.

Eriksson, K- E. L., Blandette, R. A., and Andex, P. 1989. Biodegradation of cellulase. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component. pp. 90-91, Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag.

Esser, H., Schmidt, U. 1982. Alcohol production by biotechno logy. Processing biochemistry. 46-48.

Fan, L. T., Gharpuray, M. M., and Young-Hyun Lee. 1981. Evalution of pretreatment for enzymatic conversion of agriculture residues. Biotechnology and Bioengineering Symp. 11 : 24-95.

Fero, S. 1981. Wood polysaccharide. Wood Chemistry Fundamentals and Application. pp. 49-59. New York : Academic Press.

Frederick, H. G., 1983. End products of glucose fermentation by Brochothrix thermosphacta. Applied and Environmental Microgiology. 45(1): 84-90.

Gerd Wegener. 1983. Wood as a fuel and chemical feedstock. Plant Research and Development. 18: 7-36.

Gong, C. S., and Tsao, G. T. 1983. Conversion of D-xylose to ethanol by yeast. Biotechnology Bioeng. 25: 525-554.

Gracheck, S.J., Rivers, D. B., Woodford, L. C., Giddings, K. E., and Emert, G. H. 1981. Pretreatment of lignocellulosic to supports cellulase production using Trichoderma reesei QM 9414. Biotechnology and Bioengineering Symp. 11: 47-65.

Han, Y. M., and Callihan, C.D. 1974. Cellulose fermentation : Effect of substrate pretreatment on microbial growth. Appl. Microbiol. 27: 159-165.

_____. 1978. Microbial utilization of straws. Advance in Applied Microbiology. 23 : 119-153.

Herr, D., Luck, G., and Dellweg, H. 1988. Fermentation of cellulase and degradation of cellulose by several fungi. J. Ferment. Technol. 56 (4) : 273-278.

Jacques Riviere. 1979. Alcoholic beverages. Industrial Application of Microbiology. pp. 219-237. France : Surrey Unuversity Press.

James, M. L. 1991. Industrial application of enzymes. Biochemical Engineering. pp. 83-87. New Jersey : Prentice Hall.

Kassim, E. A. 1982. Cellulase enzyme from Aspergillus niger. Microbiol-Immunol. 26 (6) : 449-454.

Kirk, T. K., connors, W. J. and Zeikus, J. G. 1977. Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. Rec. Adw. Phytochem. 2 : 369-391.

Kling, S. K., Carvalho, C. N., Ferra, M. A., Torres, J. C. R. Magalheas, D. B. and Dewey, D. Y. Ryu. 1987. Communication to the editor enchancement of enzymatic hydrolysis of sugarcan bagasse by steam explosion pretreatment. Biotechnology and Bioengineering. 14 : 1035-1039.

Kumnuanta, J., Punpeng, B., Vongsuvanlest, V., Kanagata, K., and Taguchi, H. 1981. Ethanol fermentation by floccolating yeast. Microbial Utilization of Renewable Resources. 2 : 178-180.

Kurakake, M. H., Ooshima, J. Kato and Y. Harano. 1984. Pretreatment of bagasse by noniomic surfactant for the enzymatic hydrolysis. Bioresources Technology. 49 (3) : 247-251.

Lee, S. B., I. H. Kim. D. D. Y. Ryu and H. Taguchi. 1983. Structural properties of cellulase and cellulase reaction mechanisms. Biotech Bioeng. 25 : 35-51.

Liese, W. 1975. Polysaccharase and the hydrolysis of insoluble substrate. Biological Transformation of Wood by Microorganism. New York : Springer-Varlay Berlin Heidelberg.

Linko, P., 1987. "Uber die Hertellung vol cellasen und die enzymtische spaltung vol cellulase". Chem. lng.Tech. 9 : 655.

Lyons, T. P. 1981. Gasohol A step to energy independent. p. 344. Kentucky, U.S.A. : Alltech Technical Publication.

_____. 1981. Cellulase as a raw material. Gasohol U.S.A. pp. 14-28. Kentucky, U.S.A. : Alltech Technical Publication.

Madamner, D., and Patel, S. 1992. Formation of cellulase by co-culturing of Trichoderma reesei and Aspergillus niger on cellulosic waste. World Journal of Micro biology and Biotechnology. 8 (2) : 183-186.

Makeswari, D. K., Jahan, H., Paul, J., and Varma, A. 1993. Wheat straw a potential substrate for cellulase production using Trichoderma reesei. World Joural of Microbiology and Biotechnology. 9 : 120-121.

Mandels, M., and Sternberg, D. 1976. Recent advance in cellulase technology. J. Ferment. Technol. 15 (4) : 267-286.

Mckund, V. D. 1992. Ethanol production from cellulose by coupled saccharification/fermentation using Saccharomyces cerevisiae and cellulase complex from Sclerotium rolfssi UV-8 mutant. Applied Biochemistry and Biotechnology. 36 (3) : 227-234.

Michael, R. L. 1979. Fermentable sugars from cellulose residues. Process Biochemistry. 4 (1): 21-25.

Miller, G. L. 1959. Ues of dinitrosalicytic reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 : 426-428.

Neway, J. O. 1989. Fermentation process development of industrial organism. pp. 170-313. Berkely, California : Xoma Coporation.

Nisizawa, K. 1973. " Mode of action of cellulase". J. Ferment. Technol. 51 : 267-304.

Parisi, F. 1989. " Advance in lignocellulosic hydrolysis and in the utilization of hydrolysates" In Fiechter, A. (ed.), Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology. 38 : 53-87. New York : Springer-Verlag Berlin Heideberg.

Peter Kotter, and Michael Ciriacy, 1983. Xylose fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 38 : 776-783.

Prave. P., Faust, U., Sittig, W., and Sukatsch, D. A. 1987. Fermentation processe : Ethanol wine and beer. Fundamentals of Biotechnology. pp. 382-404. Germany : Federal Republic.

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

Reese, E. T., Siu, R. C. H., Levinson, H. S. 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulosic hydrolysis. J. Bacteriol. 59 : 485-497.

_____. 1976. History of the cellulase programme at the U. S. Army Natic Department Center. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 : 9-20.

Roberto, I. C., L. S. Lacis, M. F. S. Barbosa and I. M. Mancilha. 1991. Utilization of sugarcan bagasse hemicellulose hydrolysis by Pichia stipitis for the production of ethanol. Process Biochemistry. 26 : 15-21.

Rose, A. H. 1980. Cellulase microbial enzyme and Bioconversion. p. 183-236. New York : Academics Press.

Ryu, D. D. Y., and M. Mandels. 1980. Cellulose: biosynthesis and application. Enzyme Microb Technol. April 2 : 91-102.

Saddler, J. N., Ernest, K. C. Yu., Mery Mes-Hartree, Norm Levitin and Haruld, H.B. 1983. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicellulose by microorganism for production of liquid fuels. Applied and Environment Microbiology. 45 (1) : 153-160.

_____., Chan, M. K. H., Mes-Hartree, M. and Brucil, C. 1987. Cellulase production and hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrate. Moo-Young, M. Lamptey, J., Glick, B., and Bungay, H. (edts). Biomass conversion Technology : Principle and Practhice. p. 163. New York: Pergamon Press.

_____. 1992. Biotechnology for the conversion of lignocellulose. Biomass and Biotechnology. 2 (1-6) : 229-238.

Sandhu, D. K., and Sonya Bawa. 1992. Improvement of cellulase activity in Trichoderma reesei. Applied Biotech nology and Bioengineering. 34/35 : 176.

Scragy, A. H. 1988. Enzyme technology. Biotechnology for Engineer : Biological systems in Technology. pp. 171-180. New York : Halsted Press.

Shin, S. B., Kitagawa, Y., Suga, Ken-ichi., and Ichigawa, K. 1988. Cellulase biosynthesis by Trichoderma reesei on soluble substrate. J. Ferment. Technol. 56 (4) : 396-402.

Singh, A., A. B. Adibi., N. S. Darmwal and A. K. Agrawal. 1990. Saccharification of cellulosic substrate by Aspergillus niger cellulase. World Journal of Micro biology and Biotechnology. 6 (3) : 333-336.

Sitton, O. C., Foutch, G. L., Book, N. L., and Gaddy, J, L. 1979. Ethanol from agriculture residues. Process Biochemistry. 4 (9) : 7-10.

Staniforth, A. R. 1979. Cereal straw . p. 118-119. Oxford : Clarendon Press.

Sternberg, D. D., Darval, S. 1979. Cellulase production and ammonia metabolism in Trichoderma reesei. on high level of cellulase. Biotechnology and Bioengineering. 21 : 181-191.

Stout, B. A. 1984. Raw material used in ethanol production. Energy Use and Management in Agriculture. p. 229. Agriculture Engineering Department. Taxas A & M University : Berton publichers.

Swamithan, M. S., Sprague, E. W., and Joginder, S. 1982. The present and future industrial processing of maize grian and maize stover. Processing Utilization and Marketing of Maize. pp. 300-316. New York : Art Press.

Szajer, C., and Targohski, Z. L. 1977. Lignocellulose fermen tation. Meyrath, T. and Bu'Lock, J. D. (eds.), Biotechnology and fungal differentation. New York : Academic Press.

Tanaka, M., Taniguchi, M., Morinaga, T., Mutsuno, K., and Kamikubo, T. 1980. Cellulase production of Eupencillium javanicum. J. Ferment. Technol. 25 (2) : 149-154.

Tayama, N. 1976. Feasibility of sugar production from agriculture and urban cellulosic waste with Trichoderma reesei. cellulase. Biotechnology. Bioenginering Symp. 6 : 207-219.

Tsao, G. T., Ladish, M. R., Ladish, C., HUS, T. A. Dale, B., and Chout, T. 1978. Fermentation substrate from cellulosic material : Production of fermentable sugar from cellulosic materials. Annual Report on Fermentation Process. 2 : 1-21.

_____., and Chiang Lin-Chang. 1983. Cellulase and hemicellulase technology. The Filamentous Fungi. p. 297.

_____. 1985. Ethanol and chemicals from cellulose. Processing of the International Symposium : Alternative sources of energy for agriculture. pp.117-183. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pasific Region.

Vaclar, S., Paul, N., and Tomas, V. L. 1983. Corn as a fuel crop. Energy analysis and Agriculture Application to U, S. Corn Production. p. 173-181. U.S.A. : Westriew Press.

Wilke, C. R., B. Maiurella, A.Sciamama., K. Tangnu., D. Wilcy and H. Wong. 1993. Enzymmatic Hydrolysis of Cellulose : Theory and Application. pp. 1-15. U.S.A. New Jersey : Noyes Data Corporation.

William Lockeretz. 1982. Alcohol fuels program and farm economic. Agriculture as a Producs and Consummer of Energy. p. 51,61. USA.

William, M. F., and Catherine, T. K. 1990. Microbial Enzyme and Biotechnology. pp. 1-37. New York : Elsevier Applied Science.

Wiseman, A. 1985. Application of enzyme in the food industrial Handbook of Enzyme Biotechnology. pp. 339-340. New York : Ellis Harwood.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล dextrose (glucose)	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม หั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเท่าลูกเต๋านำไปต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. ต้มให้เดือดประมาณ 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบางเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ใส่ส่วนผสมที่เหลือทั้งหมด คนให้ละลายนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. Yeast malt agar (YMA)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ อาหารเหลว สูตร YM ใช้สูตรเดียวกับ YMA แต่ไม่ต้องมี agar เตรียมโดยละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นแล้วบรรจุใส่ขวดแก้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Molasses medium (Kumnuanta et al,1981)

KH_2PO_4	0.5	กรัม
$(NH_4)_2 SO_4$	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.5	กรัม
Glucose	180.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุใส่ขวดแก้วแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

4. Production medium (หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ 2531)

$MgSO_4$	1.0	กรัม
$CaKPO_4$	0.05	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	4.0	กรัม
Corns steep liquor	7.0	กรัม
Microcrystalline cellulose	3.0	เปอร์เซ็นต์
Tween 80	20	มิลลิลิตร
$FeSO_4$	5.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4$	1.4	มิลลิกรัม
$MnSO_4$	1.6	มิลลิกรัม
$CoCl_2$	3.6	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับให้มี pH 5.5 ถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ให้มีปริมาตร 100 มล. ในกรณีที่ใช้ทดสอบการสร้างเอ็นไซม์เซลลูเลสของเชื้อราให้ใช้ microcrystalline cellulose เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้ในการผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสให้ใช้ microcrystalline cellulose 3 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ Microcrystalline cellulose ไม่ละลายน้ำ การเตรียมต้องชั่งใส่ฟลาสก์ก่อนแล้วจึงเติมสารอาหารลงไปให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

การเพาะจุลินทรีย์จากหลอด (Reviving lyophilized cultures)

1. ใช้ตะไบสำหรับเลื่อยแก้ว เลื่อยหลอดแก้วตรงตำแหน่งกึ่งกลางสำลี
2. ใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดบริเวณรอบ ๆ หลอด
3. ใช้แท่งแก้วเผาไฟให้ร้อนแดงตรงปลาย กดลงไปตรงรอยตะไบ เพื่อทำให้หลอดแก้วแตกร้าวตรงรอยที่เลื่อยไว้
4. ดึงปลายหลอดแก้วออกทิ้งในขวดน้ำยาฆ่าเชื้อ ดึงสำลีออก ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเหลวที่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ (ประมาณ 0.3 - 0.4 มล.) หยดลงไปในหลอดแก้วเพื่อละลายสารผสมเซลล์จุลินทรีย์ในหลอด
5. ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายแล้วหยดลงบนจานอาหารแข็งที่มีสูตรเดียวกันกับอาหารเหลว 1 หยด ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากหยดสารละลายนั้นเพื่อกระจายให้จุลินทรีย์เจริญทั่วจานอาหารก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม
6. นำสารละลายส่วนที่เหลือจากข้อ 5 ใส่ลงในอาหารเหลว (ประมาณ 6 มล.) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้วเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม

หมายเหตุ การเก็บรักษาหลอดเชื้อแห้งเมื่อยังไม่ต้องการเคาะ ควรเก็บไว้ในตู้เย็นหรือในที่มีอุณหภูมิต่ำ

ภาคผนวก ช

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid)

1.1 เตรียมสารละลาย 10 % NaOH 22 มล. ใส่ลงในสารละลาย Phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มล. คนให้เข้ากัน แบ่งออกมา 96 มล. เติม $NaHSO_3$ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย 1 % DNS 880 มล. และเตรียมสารละลาย Rochell salt 255 กรัม ด้วยสารละลาย 4.5 % NaOH 300 มล. จากนั้นนำมาเทรวมกับ 1 % DNS คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.1 และ1.2 มาเทรวมกันก็จะได้สารละลาย DNS สารละลายนี้ต้องใส้ไว้ในขวดสีชา แล้วนำไปใส่ตู้เย็นก่อนอย่างน้อย 1 คืน จึงจะนำไปใช้

2. การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

2.1 เตรียมสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มก./มล. ด้วยน้ำกลั่น ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.2 เติมสารละลาย DNS ลงในหลอดน้ำตาลทุกหลอด ๆ ละ 3 มล. นำไปตั้งในน้ำเดือด นาน 5 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

2.3 เติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทุกหลอด ๆ ละ 10 มล. ผสมให้เข้ากัน

2.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง 550 nm. นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3. การเตรียม 1 M. acetic acid

ตวงสารละลายกรดเข้มข้นของ acetic acid มา 60.22 มล.ใส่ลงในน้ำกลั่น 939.78 มล. คนให้เข้ากัน

4. การเตรียม 0.04 M. acetate buffer pH 5

ชั่ง sodium acetate มา 3.429 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 200 มล. แล้วเติมสารละลาย 1 M. acetic acid ลงไป 14.8 มล. เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตรคนให้เข้ากัน

5. การเตรียม 1 M. HCl

ตวง HCl conc. 97.33 มล. แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 902.46 มล. คนให้เข้ากัน

6. การเตรียม 0.05 M. citrate buffer pH 4.8

ชั่ง sodium citrate มา 14.71 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วจึงเติม 1 M. HCL ลงไป 50 มล. คนให้เข้ากัน เติม 1 M. HCl ลงไปอีก 20 มล.จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปให้ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน

7. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก

ชั่งตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักสด 10.0 กรัม โดยใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่ทราบน้ำหนักแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งดว้ยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง เมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้วนำไปเปรียบเทียบกับน้ำหนักก่อนอบ น้ำหนักที่ลดลงคือ ค่าของความชื้น คำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักสด}}$$

8.การคำนวนหาปริมาณแอลกอฮอล์

นำตัวอย่างแอลกอฮอล์มาวัดด้วยเครื่อง liquid gas chromatography ผลที่ได้จะเป็นความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ที่มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ คือมีปริมารแอลกอฮอล์ x กรัม หรือ X x 1,000 มก.ในสารละลาย 100 มล. ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ 1 มล. จึงเท่ากับ

$$\frac{X \times 1}{100} \text{ ก./มล.} = \frac{X \times 1000}{100} \text{ มก./มล.}$$

9. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธีของ Mandel และคณะ (1976)

Carboxyl methylcellulase activity method (CMCase)

1. นำ crude enzyme solution ที่ได้จากการผลิตมา 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบที่บรรจุสารละลาย 1 % CMC 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน

2. นำไป incubate ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน ประมาณ 30 นาที

3. หยุดปฏิกริยาด้วยสารละลาย DNS reagent 3 มล.

4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติมน้ำกลั่น 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน

6. นำไปอ่านค่า OD ที่ 550 nm. โดยเทียบกับหลอดควบคุมที่มี 0.05 M. sodium citrate buffer แทน 1 % CMC

7. นำค่าที่อ่านได้มาเทียบกับกราฟมาตราฐานน้ำตาลกลูโคส

8. นำค่าที่เทียบได้ไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

Filter paper activity method (FPA)

1. นำ crude enzyme solution ที่ได้จากการผลิตมา 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดทดสอบขนาด 18 มม.

2. เติม 0.05 M. sodium citrate buffer pH 4.8 จำนวน 1 มล.

3. ใส่กระดาษกรองที่ตัดเป็นชิ้นขนาด 1x6 ซม. หลอดละ 1ชิ้น เขย่าให้เข้ากัน

4. นำไป incubate ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีกระดาษ

5. หยุดปฏิกริยาด้วยสารละลาย DNS reagent 3 มล.

6. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7. เติมน้ำกลั่น 16 มล. เขย่าให้เข้ากัน

8. นำไปอ่านค่า OD ที่ 550 nm.

9. นำค่าที่อ่านได้มาเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตราฐานน้ำตาลกลูโคส

10. คำนวนหาค่า unit of enzyme

10. การคำนวนหาปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ตามหลักการของ
The International Unit of Biochemistry

1 enzyme unit = 1 mole ของ substrate ที่ถูก hydrolyse ใน 1 นาที
= 1 mole ของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที
= 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย
1.000 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่า = 1 หน่วย

$$\text{มีค่า} = \frac{0.180 \times 30}{0.185}$$

ถ้าปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัมใน 30 นาที มีค่า = (0.185 x (X)) หน่วย

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร = (0.185) x (มิลลิกรัมกลูโคส)

1.0 มิลลิลิตร = $\frac{(0.185) \times (\text{มิลลกรัมกลูโคส})}{0.5}$

$= \frac{(0.185) \times (\text{มิลลิกรัมกลูโคส})}{\text{มิลลิลิตรเอนไซม์}}$ หน่วย/มล.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอำนวย ขวัญเมือง เกิดเมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม พศ. 2509 เป็นบุตรคนที่ 6 ในจำนวนพี่น้อง 8 คน ภูมิลำเนาเดิม อ.แม่สอด จ.ตาก จบการศึกษาระดับประถมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบ้านเจดีย์โคะ ต.มหาวัน อ.แม่สอด การศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นจาก โรงเรียนพิบูลประชาสรรค์ เขตห้วยขวาง กทม. การศึกษาประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) จาก สถาบันราชมงคล วิทยาเขตปทุมธานี หลักสูตรประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (ปวส.) และหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2532 เข้าศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2534 และสำเร็จการศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2537