

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- พิสุทธิ ศาลากิจ. 2528. ป่านศรนารายณ์. วารสารเคหการเกษตร 8(9): 11-12.
- วรารุณี ครุสง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. 163 หน้า. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- อัจฉราพร ไสละสูต. 2528. ป่านศรนารายณ์(Sisal). วารสารฝ้ายและสิ่งทอ 8(30): 24-26.
- พรเทพ ถนนแก้ว, ھرรษา ปุณณะพยัคฆ์, และ มุกดา คูหิรัญ. 2538. เซลลูเลสจาก *Acrophialophora* sp. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 21. 25-27 ตุลาคม 2538. หน้า 458-459.

ภาษาอังกฤษ

- Abe, S., and Takagi, M. 1991. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Biotechnology and Bioengineering. 37: 93-96.
- Acebal, C., Castillon, M.P., Estrada, P., Mata, I., Costa, E., Aguado, J., Romero, D., and Jimenez, F. 1986. Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM9414 on physically treated wheat straw. Applied Microbiology and Biotechnology. 24: 218-223.
- Alberto, A., Ward Owen, P., and Souza'D, J. 1991. Use of mutation strategies applied to *Aspergillus terreus* ATCC 52430 to obtain mutants with improved cellulase productivity. Biotechnology Technique. 5(4): 283-288.
- Arauji, A., and Sauza'D, T. 1981. Production of biomass from enzymatic hydrolysate of agriculture waste. Journal of Fermentation Technology. 58(4): 339-401.

- Archer Daniels Midland Company, Cargill Inc., and Central Soya Company, Inc. eds. The soy protein council. Washington D.C.
- Bhalla, T.C., and Joshi, M. 1994. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10: 116-117.
- Blotkamp, P.J., Takagi, M., Pemberton, M.S., and Emert, G.H. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose and simultaneous fermentation to alcohol. American Institute of Chemical Engineers Symposium Series. 181(74): 85-90.
- Cowling, E.B., and Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrate for enzymatic conversion process. Biotechnology and Bioengineering Symposium. 6: 95-123.
- Dermirci, A., Pometto, A.L., and Johnson, K.E. 1993. Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology. 10: 116-117.
- Durand, H., Soucaille, P., and Tiraby, G. 1984. Comparative study of cellulase and hemicellulases from four fungi. Enzyme and Microbial Technology 6: 175-180.
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M., and Lee, Y.H. 1981. Evaluation of pretreatment for enzymatic conversion of agriculture residues. Biotechnology and Bioengineering Symposium. 11: 24-95.
- FAO. 1974. Hard Fiber Research Series No. 14, June.

- Ghanem, K.M. 1992. Single cell protein production from beet pulp by mixed culture. Microbiologia (Madrid) 8(1): 39-43.
- Ghosh, B.S., and Kundu, A.B. 1980. Induction of cellulases and hemicellulases by Tamarind Kernel Polysaccharide. Journal of Fermentation Technology. 58(2): 135-141.
- Goldstein, I.S. 1981. Chemicals from cellulose. Organic Chemicals from Biomass, pp. 101-124. Florida: CRC Press.
- Hagerdal, B.H., and Haggstrom, M. 1985. Production of ethanol from cellulose, solka floc BW 200, in a fedbatch mixed culture of *Trichoderma reesei*, C30, and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied microbiology and Biotechnology 22: 187-189.
- Huang, S.Y., and Chen, J.C. 1989. Ethanol production in SSF of cellulose with temperature profiling. Journal of Fermentation Technology. 66(5): 509-516.
- Hui, Z., Wei, K., Xiao, C., Wei, Z., and Jiacong, S. 1992. Simultaneous Saccharification and Isomerization by immobilized glucoamylase and glucose isomerase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 54(1): 43-46.
- Hunt, V.D. 1981. The Gasohol Handbook. Industrail Press Inc. New York. p.28-47.
- Kirk, T.K. 1983. Degradation and conversion of lignocellulose. In J.E. Smith, D.R. Berry, and B.Kristiansen (eds.), The filamentous fungi. Fungal Technology. 4: pp.226-295. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Laplace, J.M., Degenes, J.P., Moletta, R., and Navarra, J.M.

1991. Alcohol fermentation of glucose and xylcse by *Pichia stipitis.*, *Candida shehatae.*, *Saccharomyces cerevisiae.*, and *Zymomonas mobilis.* oxygen requirement as akey factor. Applied Microbiology and Biotechnology. 36(2): 158-162.
- Lock, G.W. 1969. Sisal: thirty years sisal research in Tanzania. London: Longmans Green and Co.Ltd., Great Britain.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin Phenol reagent. Biology and Chemistry. 193: 265-275.
- Lutzen, N.W., Nielsen, M.H., Oxenboell, K.M., Schulein, M., and Stentebjerg-Olesen, B. 1983. Cellulases their application in the conversion of lignocellulose to ethanol to fermentable sugars. Phil Trans R Soc Lond B. 300: 283-291.
- Lyons, T.P. 1981. Gasohol a step to energy independent. p.344. Kentucky, U.S.A.: Alltech Technical Publication.
- Madamwar, D., and Patel, S. 1992. Formation of cellulase by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(2): 183-186.
- Mandels, M., and Sternberg, D. 1976. Recent advances in cellulases technology. Journal of Fermentation Technology. 54: 267-286.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic and reagent for the determination of reducing sugars. Analysis of Chemistry. 31: 426-428.

- Mohagheghi, A., Tucker, M., Grohmann, H., and Wyman, C. 1992. High solid simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. Applied Biochemistry and Biotechnology. 33: 67-81.
- Nigam, P. 1990. Mixed culture solid-state fermentation of sugarcane bagasse for feed production. In Proceedings of the 52nd Annual Convention of the Sugar Technologists Association of India. Kampur, India.
- Nisizawa, K. 1973. Mode of action of cellulase. Journal of fermentation Technology. 51: 267-304.
- Okeke, B.C., and Obi, S.K.C. 1995. Saccharification of agro-waste materials by fungal cellulases and hemicellulases. Bioresource Technology. 51: 23-27.
- Panda, T. 1989. Simulation of shake flask conditions in a bioreactor for the biosynthesis of cellulase and xylanase by a mixed culture of *T. reesei* D1-6 and *A.wentii* Pt 2804. Process biochemistry. June: 104-108.
- Palnitkar, S., and Lachke, A.H. 1990. Efficient simultaneous saccharification and fermentation of agricultural residues by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 26(2): 151-158.
- Punnapayak, H., and Emert, G.H. 1986. Use of *Pachysolen tannophilus* in simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic. Biotechnology letters. 8(1): 63-66.
- _____, and Hoffmann, J.J. 1994. *Amsonia* spp. as potential

- fuel crops for arid lands. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10: 290-292.
- _____. , Kuhirun, M., and Thanonkeo, P. 1995. Microbial conversion of Agave biomass. Program and abstracts of SIM Annual Meeting., USA. pp.92.
- Roger, P.L., Lee, K.J., and Tribe, D.E. 1980. Process Biochemistry. 15(4), 7
- Rohde, P.A., eds. 1973. BBL manual of products and laboratory procedures. fifth ed. Maryland: Dickinson and company.
- Rose, A.H. 1980. Cellulase microbial enzyme and bioconversion. p. 183-236. New York: Academics Press.
- Roychoundhury, P.K., Ghose, T.K., and Ghosh, P. 1992. Operational strategies in vacuum coupled SSF for conversion of lignocellulose to ethanol. Enzyme Microbial Technology. 14(7): 581-585.
- Ryu, D., and Mandel, M. 1980. Cellulose: biosynthesis and application. Enzyme and Microbial Technology. 2: 91-102.
- Saddler, J.N. 1992. Biotechnology for the conversion of lignocellulose. Biomass and Biotechnol. 2(1-6): 229-238.
- Sandhu, D.K., and Arora, D.S. 1985. Cellulase production by species of *Acrophialophora*. & *Thielavia*. Indian Phytopathology. 38(2): 267-269.
- Sasaki, I. 1982. Enzymatic saccharification of rice hull cellulose. JARQ. 16(2): 144-150.
- Sexana, A., Garg, S.K., and Verma, J. 1992. Simultaneous saccharification of waste newspaper to ethanol. Bioresource Technology. 42(1): 13-15.

- Sin, R.G.H., and Reese, E.T. 1953. Decomposition of cellulose by microorganisms. Botany Review. 19: 377-416.
- Singh, A., Agrawal, A.K., Abidi, A.B., and Darmwal, N.S. 1990. Properties of cellobiase from *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology. 34: 356-358.
- Spangler, D.J., and Emert, G.H. 1986. Simultaneous saccharification and fermentation with *Zymomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering. 28(1): 115-118.
- Spindler, D.D., Wyman, C.E., Mohagheghi, A., and Grohmann, K. 1988. Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. Appl. Biochem. and Biotechnol. 17: 179-293.
- _____. , Wyman, C.E., and Grohmann, K. 1989. Evaluation of thermotolerant yeasts in controlled SSF of cellulose to ethanol. Biotechnology and Bioengineering. 34: 189-195.
- _____. , Wyman, C.E., Grohman, K., and Mohagheghi, A. 1989. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol with selected yeast strains and β -glucosidase supplementation. Applied Biochemistry and Biotechnology. 20/21: 529-540.
- _____. , Wyman, C.E., Grohmann, K., and Philippidis, G.P. 1992. Evaluation of the cellobiose fermenting yeast *Brettanomyces custerii* in the SSF of cellulose. Biotechnology Letters. 14(5): 403-407.
- Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Emert, G.H., and Yata, N. 1977. A method for production of alcohol directly from cellulose using cellulase and yeast. In proceedings of Bioconversion

- Symposium. New Delhi: Indian Institute of Technology.
- Tangnu, S.K. 1982. Process development for ethanol production based on enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass Process Biochemistry. May/June: 36-49.
- Tsao, G.T., and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology. In J.E. Smith, D.R. Berry, and B. Kristiansen (eds.), The filamentous fungi. Fungal Technology. 4: pp. 296-326. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Voet, D., and Voet, J.G. 1990. Biochemistry. pp. 446-448. John Wiley & Sons Inc.
- Webb, C., Fukuda, F., and Atkinson, B. 1986. The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. Biotechnology and Bioengineering. 28: 41-47.
- Wright, J.D., Wyman, C.E., and Grohmann, K. 1988. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: process evaluation. Applied Biochemistry and Biotechnology. 18: 75-90.
- Wyman, C.E., Spindler, D.D. and Grohmann, K. 1992. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. Biomass and Bioenergy. 3(5): 301-307.
- Zabriskie, D.W., Qutabuclidin, S.A.S.M., and Dowing, K.W. 1980. Production of ethanol from cellulose using a soluble cellulose derivative as an intermediate. Biotechnology and Bioengineering Symposium. 10: 149-162.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Potato dextrose agar (PDA)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร

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

วิธีการเตรียม

ต้มมันฝรั่งที่หั่นเป็นชิ้นขนาดเท่าลูกเต๋าในน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร ให้เดือด ประมาณ 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ใส่ส่วนประกอบที่เหลือทั้งหมด คนจนละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. Yeast malt broth (YMB)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Bacto-peptone	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3. Production medium

(พรเทพ ถนนแก้ว, หารรษา ปุณณะพยัคฆ์ และ มุกดา กุหิรัญ 2538)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร

MgSO ₄	1.0	กรัม
CaHPO ₄	5.0	กรัม
NH ₄ NO ₃	4.0	กรัม
Cornsteep liquor	7.0	กรัม
Microcrystalline cellulose	30.0	กรัม
Casein	1.0	กรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
FeSO ₄	5.0	มิลลิลิตร
ZnSO ₄	1.4	มิลลิลิตร
MnSO ₄	1.6	มิลลิลิตร
CoCl ₂	3.6	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับให้มี pH 5.0 ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อ

หมายเหตุ Microcrystalline cellulose ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงต้องชั่งใส่พลาสติกก่อน แล้วจึงเติมสารอาหารลงไปให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ

4. F₂ medium (Punnapayak and Emert, 1986)

ส่วนประกอบของสูตรอาหาร

(NH ₄) ₂ SO ₄	30.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.2	กรัม
CaCl ₂	1.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย DNS (dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959)

1.1 เตรียมสารละลาย NaOH 10 % ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย Phenol 10 กรัม เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 96 มิลลิลิตร เติม NaHSO₃ 9.6 กรัม คนให้เข้ากัน

1.2 เตรียมสารละลาย DNS 1 % ปริมาตร 880 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย Rochell salt 25.5 กรัม ด้วยสารละลาย NaOH 4.5 % ปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1 % คนให้เข้ากัน

1.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 มาเทรวมกัน ก็จะได้สารละลาย DNS ซึ่งต้องใส่ไว้ในขวดสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน จึงจะนำไปใช้ได้

2. การเตรียมสารละลาย Lowry (Lowry et al., 1951)

2.1 สารละลาย Lowry A

Na ₂ CO ₃	20.0	กรัม
NaOH	4.0	กรัม
Rochell salt	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.2 สารละลาย Lowry B

CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2.3 สารละลาย Lowry C

Lowry A : Lowry B	50:1	
-------------------	------	--

2.4 สารละลาย Lowry D

Folin phenol reagent: น้ำกลั่น 1:1

หมายเหตุ สารละลาย Lowry C และ Lowry D ต้องเตรียมก่อนใช้

3. การเตรียม 0.04 M. Acetate buffer pH 5.0

ชั่ง Sodium acetate จำนวน 3.429 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 1 M. Acetic acid ลงไป 14.8 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน

4. การเตรียม 1 M. Acetic acid

ตวงสารละลายกรดเข้มข้น Acetic acid 60.22 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

5. การเตรียม 1 M. HCl

ตวงสารละลายเข้มข้น HCl 97.33 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

6. การเตรียม 0.05 M. Citrate buffer pH 4.8

ชั่ง Sodium citrate 14.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติม 1 M. HCl จำนวน 70 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

หมายเหตุ ถ้าเตรียม 0.1 M. Citrate buffer pH 4.8 ให้ใช้ Sodium citrate 29.42 กรัมและเตรียมวิธีการเดียวกัน

7. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา FPA ตามวิธีการของ Mandels และ Sternburg (1976)

7.1 นำ crude enzyme มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

7.2 เติม 0.05 M. citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) เขย่าให้เข้ากัน

7.3 นำไปอุ่นใน Waterbath ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง

7.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 16 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

8. การวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส โดยการวิเคราะห์หา CMCase ตามวิธีการของ Acebal และคณะ (1986)

8.1 นำ crude enzyme มา 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ

8.2 เติม 0.1 M. Citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.95 มิลลิลิตร และเติม 2 % CMC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

8.3 นำไปอุ่นใน Waterbath ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที

8.4 เติมสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

8.5 เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า unit of enzyme

9. การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

9.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ลงในหลอดทดลอง

9.2 เติมสารละลาย DNS ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ ข. 1

10. การทำกราฟโปรตีนมาตรฐาน

10.1 เตรียมสารละลาย BSA (Bovine Serum Albumin) ให้มีความเข้มข้น 0 0.02 0.04 0.06 0.08 0.10 0.12 0.14 0.16 0.18 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นใส่ในหลอดทดลอง

10.2 เติมสารละลาย Lowry C ลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

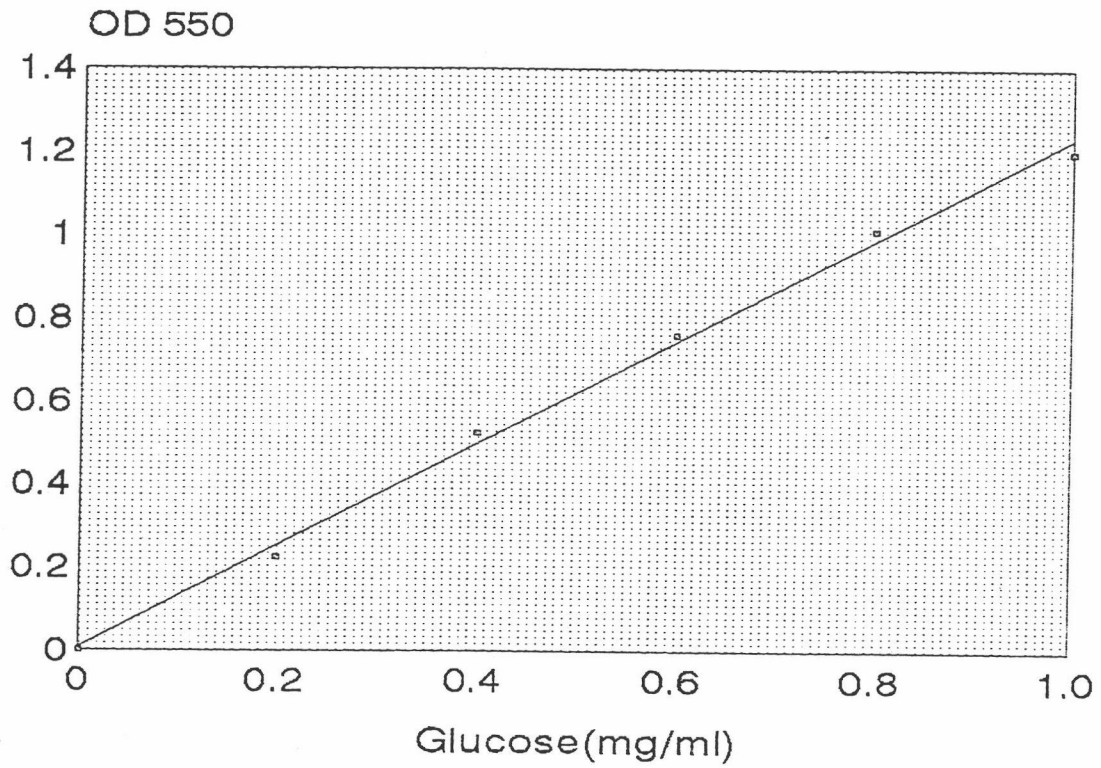
10.3 เติมสารละลาย Lowry D ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน ดังรูปที่ ข. 2

การคำนวณปริมาณโปรตีน

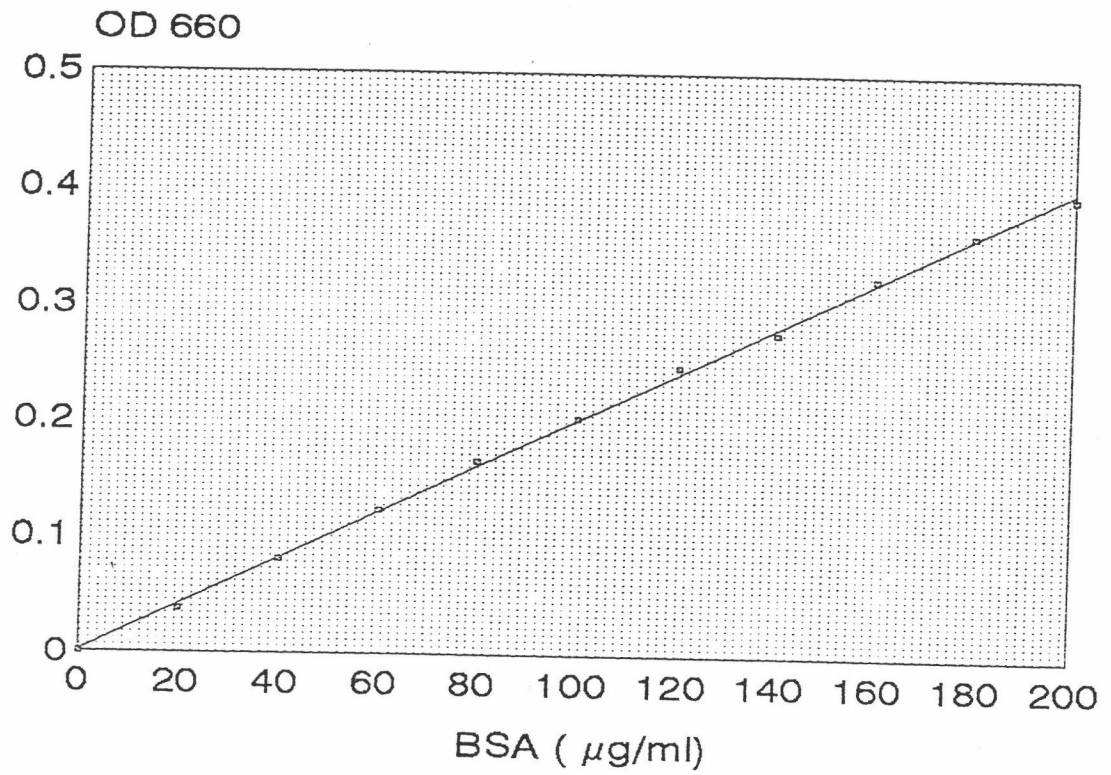
กำหนดให้ X = ปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ (มก./มล.)

Y = ปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่ใช้ทดสอบ (มล.)

นั่นคือ ปริมาณโปรตีน = $\frac{X}{Y}$ = มก./มล.



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐาน



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ(1977)
โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

11. การคำนวณค่า unit of enzyme ตามวิธีการของ The International Union of Biochemistry

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

นั่นคือ

$$\begin{aligned} 1 \text{ หน่วยของเอนไซม์} &= 1 \text{ ไมโครโมลของสับสเตรทที่ถูกย่อยใน } 1 \text{ นาที} \\ &= 1 \text{ ไมโครโมลของกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 1 \text{ นาที} \\ &= 0.18 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 1 \text{ นาที} \end{aligned}$$

การคำนวณค่า FPA จะได้ว่า

ถ้า 0.18 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

$$1.00 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 60 \text{ นาที มีค่า} = \frac{1}{0.18 \times 60} \text{ หน่วย}$$

$$\text{มีค่า} = 0.093$$

สมมุติปลดปล่อยกลูโคส X มิลลิกรัม ใน 60 นาที มีค่า = X x 0.093 หน่วย

จากการทดลองใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร = X x 0.093 หน่วย

$$\begin{aligned} \text{ถ้าใช้เอนไซม์ } 1.0 \text{ มิลลิลิตร} &= \frac{X \times 0.093}{0.5} \text{ หน่วย} \end{aligned}$$

$$\text{หรือ} = \frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 0.093}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}} = \text{หน่วย/มล.}$$

ในการคำนวณค่า CMCase จะได้ว่า

ถ้า 0.18 มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

$$1.00 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน } 10 \text{ นาที มีค่า} = \frac{1}{0.18 \times 10} \text{ หน่วย}$$

$$\text{มีค่า} = 0.555$$

$$\begin{aligned}
 \text{สมมุติปลดปล่อยกลูโคส } X \text{ มิลลิกรัม ใน } 10 \text{ นาที มีค่า} &= X \times 0.555 \text{ หน่วย} \\
 \text{จากการทดลองใช้เอนไซม์ } 0.05 \text{ มิลลิลิตร} &= X \times 0.555 \text{ หน่วย} \\
 \text{ถ้าใช้เอนไซม์ } 1.0 \text{ มิลลิลิตร} &= \frac{X \times 0.555}{0.05} \text{ หน่วย}
 \end{aligned}$$

$$\text{หรือ} = \frac{\text{มิลลิกรัมกลูโคส} \times 0.555}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}} = \text{หน่วย/มล.}$$

12. การคำนวณหาปริมาณเอทานอล

นำค่า Peak area ของเอทานอลมาตรฐานที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography ดังแสดงในรูปที่ ข.3 ไป plot กราฟมาตรฐานของเอทานอล (รูปที่ ข.4) จากนั้นนำค่า area ของตัวอย่างไปหาค่าปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐาน ผลที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ นั่นคือ มีปริมาณเอทานอลในสารละลาย 100 มล. หรือ นำมาคำนวณให้มีหน่วยเป็น กรัมเอทานอลต่อกรัมสับสเตรท (ก./ก.) จะได้ว่า

$$\frac{\text{ปริมาณเอทานอล (ก./100มล.)}}{\text{ปริมาณของสับสเตรทที่ใช้ (ก.)}} = \text{ก./ก.}$$

START 00.00.00.00.

STOP

1.88

C-R1A
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 27
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.88	99.9999		256568
	TOTAL		99.9999		256568

START 00.00.00.00.

STOP

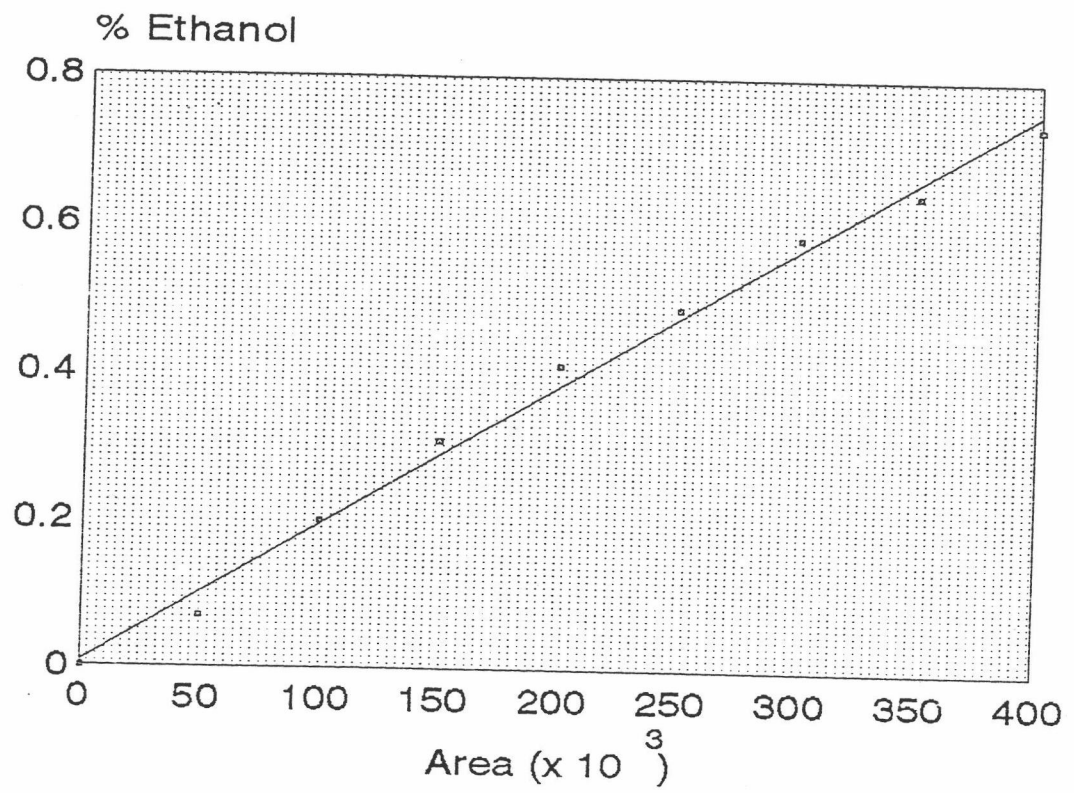
1.88

C-R1A
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 28
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		1.88	99.9999		379659
	TOTAL		99.9999		379659

รูปที่ ข.3 แสดงโครมาโตแกรมและพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของเอทานอล
 มาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วย Gas liquid chromatography

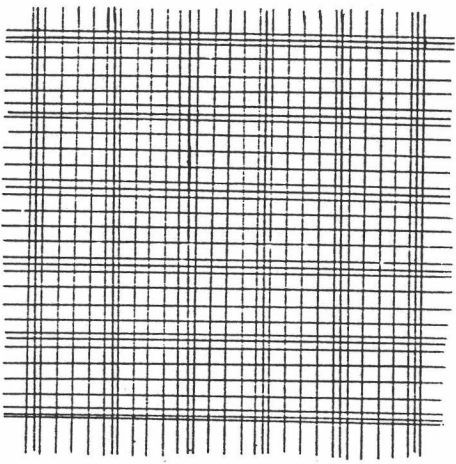
เปอร์เซ็นต์เอทานอลมาตรฐาน	Peak area
0.1	72389
0.2	100528
0.3	146221
0.5	256568
0.7	379659



รูปที่ ข.4 กราฟเอทานอลมาตรฐาน

13.การนับจำนวนเซลล์ ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemocytometer

นำน้ำหมักตัวอย่าง 1 ml. มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 ml. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปหยดลงบน Haemocytometer นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อนำ Haemocytometer มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นดังภาพ



ประกอบด้วยช่องใหญ่จำนวน 25 ช่อง แต่ละช่องใหญ่ประกอบด้วยช่องเล็ก 16 ช่อง
วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 มม.³
 สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = X เซล
 สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = Y เซล
 นั่นคือ X = 16Y เซล

ดังนั้น

ใน 0.1 มม.³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Xx25 หรือ Yx16x25 เซล
 ใน 1.00 มม.³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Xx25x10 หรือ Yx16x25x10 เซล
 ใน 0.1 มม.³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Xx25x10x1000 หรือ Yx16x25x10x1000 เซล
 = 25Xx10⁴ หรือ 4Yx10⁶ เซล

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.1. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่ปริมาณเอนไซม์แตกต่างกัน 4 ระดับ

ปริมาณเอนไซม์	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)				ค่าเฉลี่ย
10	0.5210	0.5090	0.4286	0.3798	0.4596 ^c
15	0.4221	0.4796	0.5181	0.6164	0.5091 ^{bc}
20	0.5860	0.5780	0.5720	0.6086	0.5862 ^{ab}
25	0.6032	0.6185	0.6190	0.6130	0.6134 ^a

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	3	0.0597	0.0199	6.9211**
error	12	0.0345	0.0029	
total	15	0.0942		

C.V. = 9.89 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on mean ranks

treatment 4 = 0.6134 a

treatment 3 = 0.5862 ab

treatment 2 = 0.5091 bc

treatment 1 = 0.4596 c

sort on treatment arrangements

treatment 1 = 0.4596 c

treatment 2 = 0.5091 bc

treatment 3 = 0.5862 ab

treatment 4 = 0.6134 a

2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล
ตารางที่ ค.2. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน 4 ระดับ

ความเข้มข้นยีสต์(เซลล์/มล.)	ปริมาณเอทานอล (กรัม/100มล.)	ค่าเฉลี่ย
10 ⁷	0.4618 0.4620 0.4095 0.3501	0.4184 b
10 ⁸	0.7126 0.6130 0.5770 0.6340	0.6341 a
10 ⁹	0.7826 0.5370 0.5423 0.4713	0.5833 a
10 ¹⁰	0.6943 0.7625 0.6798 0.5812	0.6795 a

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	3	0.1558	0.0519	6.8889**
error	12	0.0905	0.0075	
total	15	0.2463		

C.V. = 15.00 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on mean ranks

treatment 4 = 0.6795 a

treatment 2 = 0.6341 a

treatment 3 = 0.5833 a

treatment 1 = 0.4184 b

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on treatment arrangement

treatment 1 = 0.4184 b

treatment 2 = 0.6341 a

treatment 3 = 0.5833 a

treatment 4 = 0.6795 a

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ก.3. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นแตกต่างกัน 5 ระดับ

ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)	ค่าเฉลี่ย
4.0	0.4226 0.3906 0.3936 0.4477	0.4136 b
4.5	0.4343 0.4476 0.4184 0.4092	0.4274 b
5.0	0.5195 0.5203 0.5305 0.5069	0.5193 a
5.5	0.3796 0.3622 0.3567 0.3633	0.3654 c
6.0	0.4673 0.4457 0.4120 0.3897	0.4287 b

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	4	0.0497	0.0124	25.8928**
error	15	0.0072	0.0005	
total	19	0.0568		

C.V. = 5.08 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on mean ranks

treatment 3 = 0.5193 a

treatment 5 = 0.4287 b

treatment 2 = 0.4274 b

treatment 1 = 0.4136 b

treatment 4 = 0.3654 c

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on treatment arrangement

treatment 1 = 0.4136 b

treatment 2 = 0.4274 b

treatment 3 = 0.5193 a

treatment 4 = 0.3654 c

treatment 5 = 0.4287 b

4. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : อุณหภูมิที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.4. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ

อุณหภูมิ (°ซ)	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)	ค่าเฉลี่ย
37	0.4709 0.4896 0.5417 0.3393	0.4604 ^c
40	0.5195 0.5203 0.5305 0.5069	0.5193 ^{bc}
43	0.5499 0.6777 0.5622 0.5684	0.5870 ^b
45	0.8535 0.8302 1.0250 0.9412	0.9125 ^a

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.05

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	3	0.4890	0.1630	34.1428**
error	12	0.0573	0.0048	
total	15	0.5463		

C.V. = 11.15 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on mean ranks

treatment 4 = 0.9125 a

treatment 3 = 0.5870 b

treatment 2 = 0.5193 bc

treatment 1 = 0.4604 c

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on treatment arrangement

treatment 1 = 0.4604 c

treatment 2 = 0.5193 bc

treatment 3 = 0.5870 b

treatment 4 = 0.9125 a

5. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเติมอาหารเสริม 2 ชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ต่อการผลิตเอทานอลและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : ความเป็นกรด-ค่างเริ่มต้นที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.5. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่มีการเติมอาหารเสริม soy peptone และ casein peptone ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ชนิดของ อาหารเสริม	ระดับ ความเข้มข้น	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มิลลิลิตร)				ค่าเฉลี่ย
control	0%	0.7479	0.6875	0.7252	0.7115	0.7180 cd
casein peptone type S	0.025%	0.3925	0.4280	0.4945	0.5225	0.4594 e
	0.05%	0.9511	1.4745	1.3748	1.2668	1.267 a
	0.075%	0.6175	0.6527	0.7108	0.6829	0.6660 d
	0.1%	0.7532	0.7029	0.6898	0.6658	0.7029 cd
soy peptone	0.025%	0.5985	0.6073	0.5802	0.6273	0.6033 d
	0.05%	0.6595	0.6842	0.6714	0.6402	0.6638 d
	0.075%	0.9567	0.9091	0.9243	0.9303	0.9301 b
	0.1%	0.8548	0.7832	0.7648	0.8296	0.8081 c

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	8	1.7043	0.2130	31.1796**
error	27	0.1845	0.0068	
total	35	1.8888		

C.V. = 10.91 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on. mean ranks

treatment 3 = 1.2668 a

treatment 8 = 0.9301 b

treatment 9 = 0.8080 c

treatment 1 = 0.7180 cd

treatment 5 = 0.7029 cd

treatment 4 = 0.6660 d

treatment 7 = 0.6638 d

treatment 6 = 0.6033 d

treatment 2 = 0.4594 e

sort on treatment arrangement

treatment 1 = 0.7180 cd

treatment 2 = 0.4594 e

treatment 3 = 1.2668 a

treatment 4 = 0.6660 d

treatment 5 = 0.7029 cd

treatment 6 = 0.6033 d

treatment 7 = 0.6638 d

treatment 8 = 0.9301 b

treatment 9 = 0.8081 c

6. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอายุเชื้อราเริ่มต้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : อายุเชื้อราเริ่มต้นที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.6. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่อายุเชื้อราเริ่มต้นแตกต่างกัน

อายุเชื้อรา (วัน)	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)				ค่าเฉลี่ย ^{ns}
6	0.3926	0.4070	0.3985	0.3091	0.3750
9	0.3932	0.2369	0.3673	0.3305	0.3319
12	0.3092	0.3651	0.3672	0.4069	0.3621

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	2	0.0042	0.0021	0.7491 ^{ns}
error	9	0.0251	0.0028	
total	11	0.0293		

C.V. = 14.79 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

7. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ร่วมกัน

สมมุติฐาน : ความเข้มข้นยีสต์เริ่มต้นที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.7. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่ความเข้มข้นยีสต์แตกต่างกัน 4 ระดับ

ความเข้มข้นยีสต์(เซลล์/มล.)	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)	ค่าเฉลี่ย ns
10 ⁷	0.3342 0.3767 0.2919 0.2593	0.3155
10 ⁸	0.3932 0.2369 0.3673 0.3305	0.3320
10 ⁹	0.3036 0.3852 0.4263 0.3408	0.3639
10 ¹⁰	0.4721 0.3609 0.3377 0.4202	0.3977

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA				
sov	df	ss	ms	F
treatment	3	0.0159	0.0053	1.5339 ^{ns}
error	12	0.0414	0.0034	
total	15	0.0572		

C.V. = 16.66 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

8. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อ
 จุลินทรีย์ร่วมกันและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)
 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Banana

สมมุติฐาน : อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ตารางที่ ค.8. แสดงผลการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ

อุณหภูมิ (° ซ)	ปริมาณเอทานอล(กรัม/100มล.)	ค่าเฉลี่ย
37	0.5535 0.4889 0.5590 0.5318	0.5333 b
40	0.4577 0.2822 0.3072 0.5402	0.3968 c
43	0.3112 0.3750 0.3890 0.3790	0.3636 c
45	0.7662 0.8140 0.7787 0.7709	0.7822 a

ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$

ANOVA

sov	df	ss	ms	F
treatment	3	0.4343	0.1448	32.3645**
error	12	0.0537	0.0045	
total	15	0.4880		

C.V. = 12.89 %

*,** = significant at 95%, 99% level

ns = non significant at 95% level

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on mean ranks

treatment 4 = 0.7822 a

treatment 1 = 0.5333 b

treatment 2 = 0.3968 c

treatment 3 = 0.3636 c

treatment difference at 95% level in DMRT

sort on treatment arrangement

treatment 1 = 0.5333 b

treatment 2 = 0.3968 c

treatment 3 = 0.3636 c

treatment 4 = 0.7822 a

ประวัติผู้เขียน

นางสาว สันทนา เสถียรไพศาล เกิดวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2512 ที่ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพืชสวน ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2532 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2535

