ภาคผนวก

ภาคผนวก

1.การเตรียมกล้าเชื้อ

1.1 นำเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevesiae* จาก stock culture มาทำการเพาะเลี้ยงแบบ cross streak บนจานอาหาร PDA แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่ได้จากข้อ 1.1 มาเพาะเลี้ยงบน PDA slant แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในขวดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ

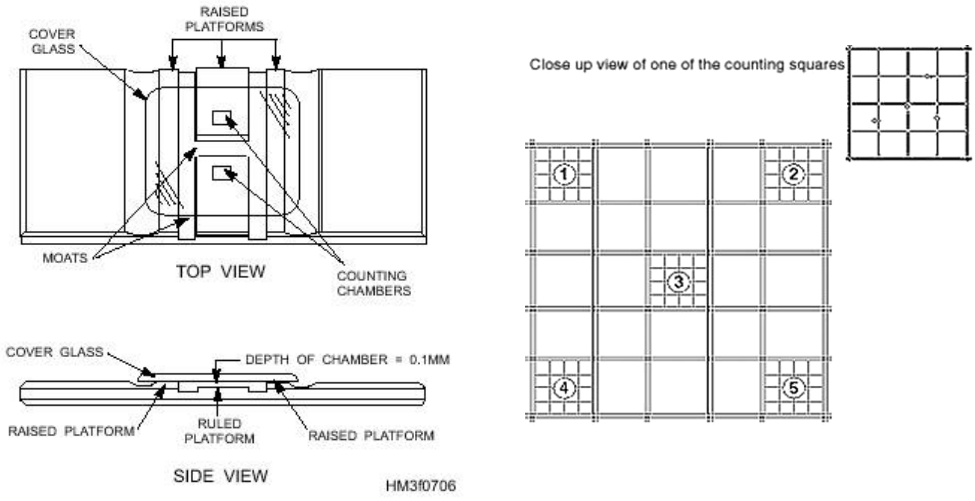
2.การนับจำนวนเซลล์ที่แขวนลอยในน้ำหมักโดยใช้ Hemocytometer

2.1 ทำการเจือจางตัวอย่างสารละลายตั้งต้น(น้ำหมัก) ด้วยสารละลาย methylene blue ที่ระดับการเจือจาง 10 เท่า หรือ 100 เท่า

2.2 หยดตัวอย่างสารละลายตั้งต้น(น้ำหมัก) ที่เจือจางลงบน Hemocytometer

2.3 นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก (ตามภาพด้านล่าง) บน Hemocytometer

จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก x 5 x dilution factor x 10^4

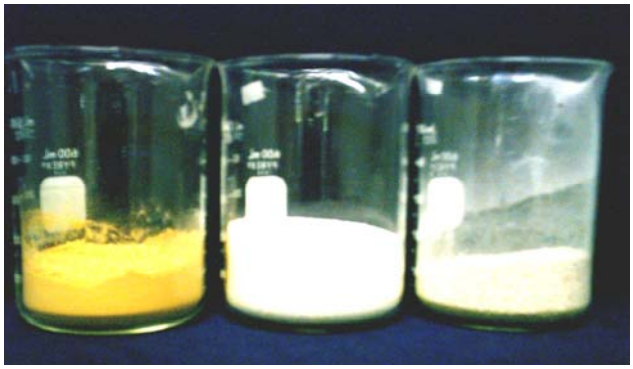


รูปแสดงการนับจำนวนเซลล์ที่แขวนลอยในน้ำหมัก

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1. อาหารที่เตรียมเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตรประกอบด้วยสารเคมีดังนี้

3.1.1. Yeast extract	10 g.
3.1.2. Dextrose	20 g.
3.1.3 Peptone	20 g.



ภาพแสดง สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย Yeast extract, Dextrose และ Peptone เรียงตามลำดับ

ภาพแสดง การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
(เพื่อให้สารเคมีทั้งหมดละลายเข้ากันได้ดีจะทำการต้มเพื่อเพิ่มอัตราของการละลาย)

3.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอ(Autoclave) ที่ความดัน 15 P/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3.3 ทิ้งให้เย็นลง 10-20 นาที แล้วนำกล้าเชื้อยีสต์มาใส่

3.4 นำไปเพาะเลี้ยงโดยบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักและทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ต่อไป

ภาพแสดง การเพาะเลี้ยงโดยบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30 ° C

4.การทำให้ปลอดเชื้อ

การทำให้ปลอดเชื้อภายในถังหมัก จะใช้สารละลาย potassium metabisulfite (KMS) ที่ความเข้มข้น 200 ppm. โดยสารละลาย KMS นี้จะใช้เวลาในการสลายตัว 10 -12 ชั่วโมง นำไปเทลงในถังหมักให้เต็มแล้วปิดทางเข้าออกของถังหมักทิ้งไว้ 1 วันเพื่อทำให้สารละลาย KMS ไม่หลงเหลืออยู่อีกเลย จากนั้นทำการถ่ายน้ำทิ้งแล้วรีบปิดทางเข้าออกของถังเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อที่อยู่ในอากาศเข้าไปปนเปื้อนภายในถังหมัก

ส่วนถังที่ใช้เก็บสารละลายตั้งต้น(น้ำหมัก)และถังที่จะใช้เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักจะใช้วิธีทำให้ปลอดเชื้อโดยการนำไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ความดัน 15 P/in^2 อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลง 1-2 ชั่วโมง

ภาพแสดง สารเคมีที่ใช้ในการทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้สาร potassium metabisulfite (KMS)

ก. **ข.**

รูป ก. แสดงถังที่ใช้บรรจุสารละลายตั้งต้น(น้ำหมัก)

รูป ข. แสดงหม้อนึ่งความดันไอน้ำ(Autoclave)

5.การวิเคราะห์หาน้ำตาล

การวิเคราะห์หาน้ำตาลเป็นวัตถุประสงค์หลักของการทดลองในโครงการนี้ก็ว่าได้ เพื่อให้ทราบว่าวัตถุดิบที่ใช้ คือ น้ำตาลที่อยู่ในสารละลายตั้งต้นเมื่อผ่านกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้วิธีการตรึงแกลบร่วม จะเหลือน้ำตาลออกมาเท่าใด หากเหลือออกมาปริมาณน้อยจะทำให้ในกระบวนการหมักมีการใช้น้ำตาลมากซึ่งจะเป็นผลดีในทางเศรษฐศาสตร์ ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลที่ได้ออกมานั้นต้องวิเคราะห์จากสภาวะต่างๆ โดยการใช้เครื่อง Spectrophotometer Pharmacia Biotech ซึ่งอาศัยหลักการดูดกลืนแสงของของเหลวแล้วบอกเป็นค่าๆหนึ่ง โดยค่าที่มากแสดงว่ามีการดูดแสงมาก และมีการซึมผ่านได้น้อย นั่นคือหากมีความเข้มมากแสดงว่าพบน้ำตาลมาก ซึ่งมีวิธีการหาปริมาณน้ำตาลที่ได้ออกมาพร้อมกับผลิตภัณฑ์ โดยวิธีดีเอ็นเอส (DNS method) เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สารเคมี

1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมโดยชั่ง DNS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 ml เติมสารละลายด่างทีละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 ml) คนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate ลงไป ทีละน้อยจนครบ 300 กรัม เติม sodium sulfite 0.5 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 ml เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 mg/ml จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0-1.0 mg/ml ดังนี้

หลอดที่	สารละลายกลูโคสเข้มข้น (1.0 mg/ml) (ml)	น้ำกลั่น (ml)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (mg/ml)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.2
3	0.4	0.6	0.4
4	0.6	0.4	0.6
5	0.8	0.2	0.8
6	1.0	0.0	1.0

วิธีการวิเคราะห์

5.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง(Standard) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 ระดับดังนี้ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1mg.ต่ออัตราส่วนปริมาตรสารละลาย 1 ml.

5.2 เติม 11.9 NHCl จำนวน 20 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที

5.3 ทิ้งให้เย็น แล้วทำการปรับค่า pH โดยใช้สาร 5 N KOH จำนวน 50 µl ผสมให้เข้ากัน

5.4 จะได้สารละลายตัวอย่าง (Standard) 5 ค่าเป็นตัวเทียบโดยจะนำไปหาสมการเชิงเส้นเพื่อวิเคราะห์หาน้ำตาลจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักต่อไป

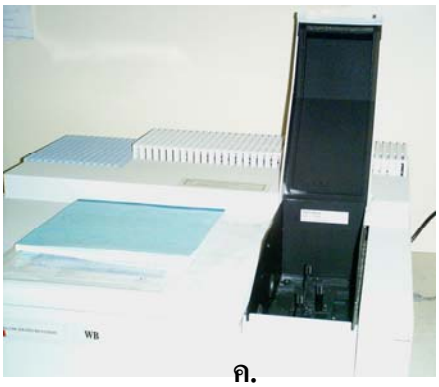
5.5 จากนั้นดูดสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสภาวะต่างๆมาอย่างละ 500 µl และเติม DNS reagent 500 µl ผสมให้เข้ากัน

5.6 นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น 5-10 นาที

5.7 เติมน้ำบริสุทธิ์ในสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสภาวะต่างๆ อย่างละ 5 µl

5.8 นำไปวัดค่า OD ที่เครื่อง Spectrophotometer Pharmacia Biotech โดยหาค่าของสารละลายตัวอย่าง(Standard) ที่มีน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ต่ออัตราส่วนปริมาตร 1 ml. ก่อนเพื่อนำมาพล็อตกราฟหาสมการเส้นตรง

5.9 จากนั้นนำสารละลายผลิตภัณฑ์จากสภาวะต่างๆ ที่เตรียมไว้มาหาค่า OD ที่เครื่อง Spectrophotometer Pharmacia Biotech แล้วนำค่าที่ได้มาแทนในสมการของสารละลายตัวอย่าง (Standard) ก็จะได้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาล[w/v]ที่เหลือจากการใช้ในกระบวนการหมัก



ค.

ง.

ภาพ ค. Spectrophotometer Pharmacia Biotech และ ง. Computerแสดงผลแสดงชุดเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำตาล โดยใช้หลักการดูดกลืนแสงของวัตถุ(เหลว)

6. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วย Gas chromatography (GC)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายเอทานอล 1% และสารละลายบิวทานอล 1%

ดูดเอทานอลหรือบิวทานอลความเข้มข้น ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย GC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร. ใส่ลงใน volumetric flask ปริมาตร 100 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายเอทานอล 1% หรือสารละลายบิวทานอล 1% สำหรับการทำกราฟมาตรฐาน จะใช้ปริมาณเอทานอล 1% และบิวทานอล 1% ดังนี้

หลอดที่	เอทานอล 1% (μl)	บิวทานอล 1% (μl)	น้ำกลั่น (μl)	ความเข้มข้นเอทานอล (%v/v)
1	100	500	400	0.2
2	200	500	300	0.4
3	300	500	200	0.6
4	400	500	100	0.8
5	500	500	0	1.0

วิธีวิเคราะห์

6.1 เจือจางตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ (ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว) ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม

6.2 ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 500 μl ผสมกับบิวทานอล 1% ปริมาตร 500 μl

6.3 ฉีดตัวอย่างปริมาตร 5 μl .ใส่ในช่อง injection port ของเครื่อง GC สภาวะที่ใช้คืออุณหภูมิของ column oven, injection port และ detector เท่ากับ 100 150 และ 180 °C ตามลำดับ

วิธีคำนวณปริมาณเอทานอล

(1) ทำกราฟมาตรฐานโดยนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ1.0 %v/v ต่อพื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล แทนค่าในแกน X และค่าความเข้มข้นของเอทานอลแทนค่าในแกน Y

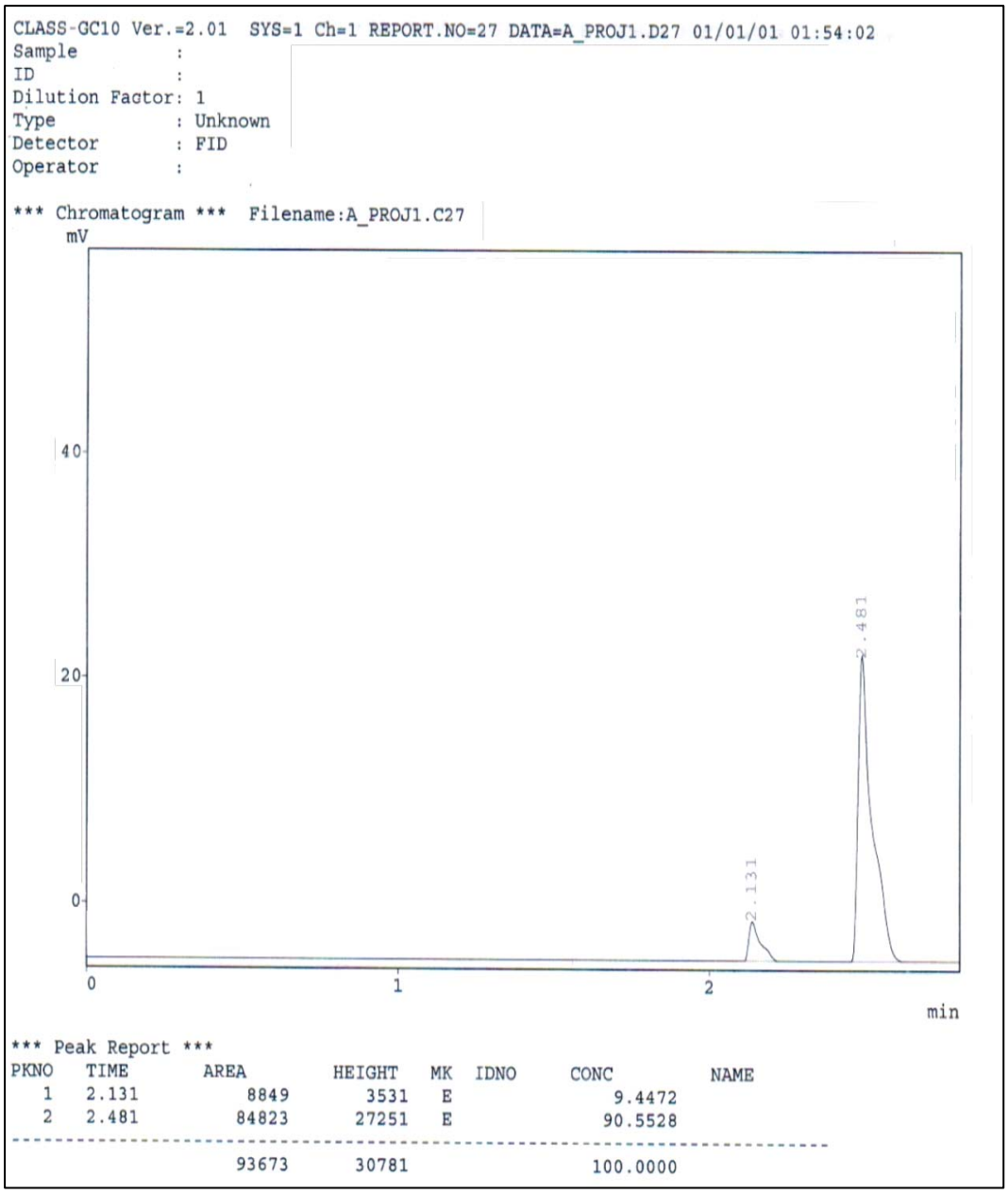
(2) แทนค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลที่วิเคราะห์ได้ของตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้กราฟของบิวทานอลลงในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานจะได้ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลในตัวอย่างที่วิเคราะห์

ปริมาณเอทานอลที่ได้จะมีค่าความเข้มข้นมีหน่วยเป็น % v/v จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณเอทานอลหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร โดย

ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) = ความเข้มข้นเอทานอล % v/v × D × 10

D = ค่าความหนาแน่นของเอทานอลที่อุณหภูมิ 20 °C = 0.7896

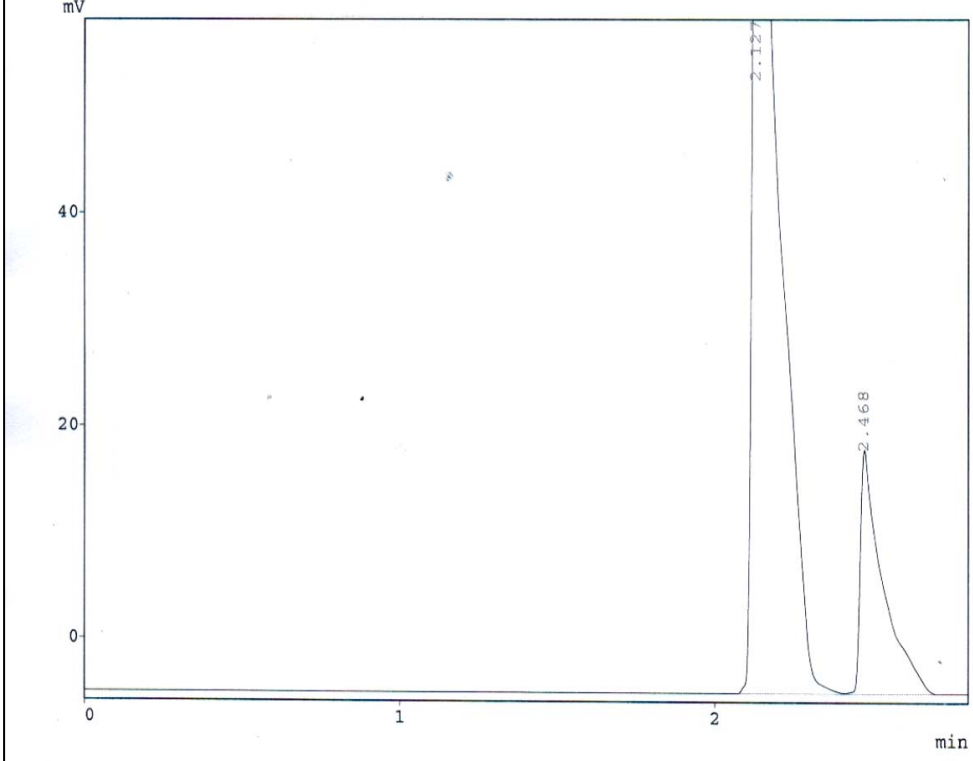
รูปแสดงชุดเครื่องมือวิเคราะห์เอทานอล โดยใช้เครื่อง Gas chromatography (GC)



ตัวอย่างรูปกราฟ ที่ได้จากเครื่อง Gas chromatography (GC)แสดงค่า สาร Standard mu ที่ความเข้มข้นบิวทานอล 0.2

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=4 DATA=A_PROJ1.D04 01/01/01 00:39:22
Sample :
ID :
Dilution Factor: 1
Type : Unknown
Detector : FID
Operator :

*** Chromatogram *** Filename:A_PROJ1.C04

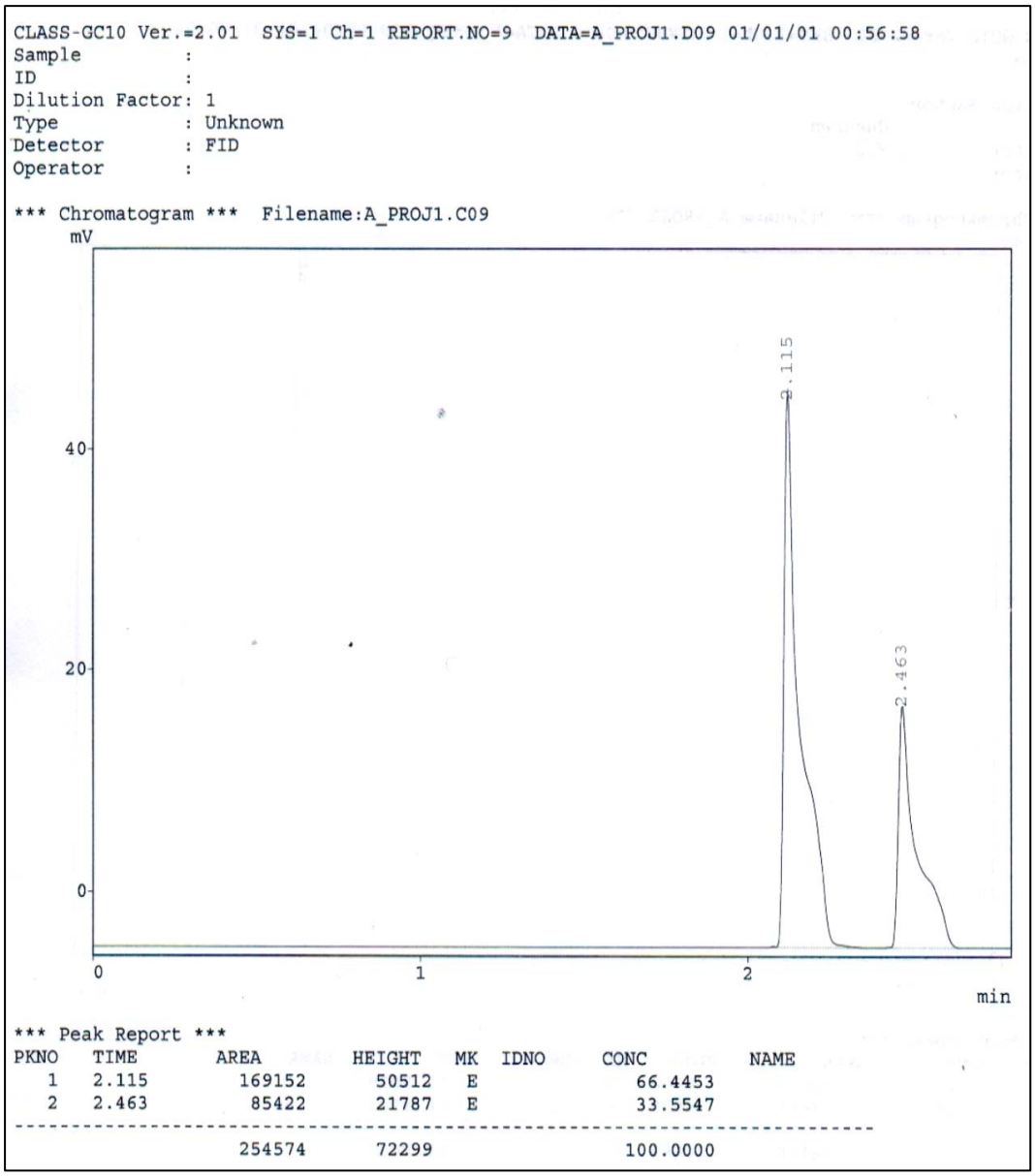


*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.127	554206	111280			82.9698	
2	2.468	113755	22918	VE		17.0302	
		667962	134198			100.0000	

ตัวอย่างรูปกราฟ ที่ได้จากเครื่อง Gas chromatography (GC)

แสดงค่า สารละลายผลิตภัณฑ์ของแบบ Batch

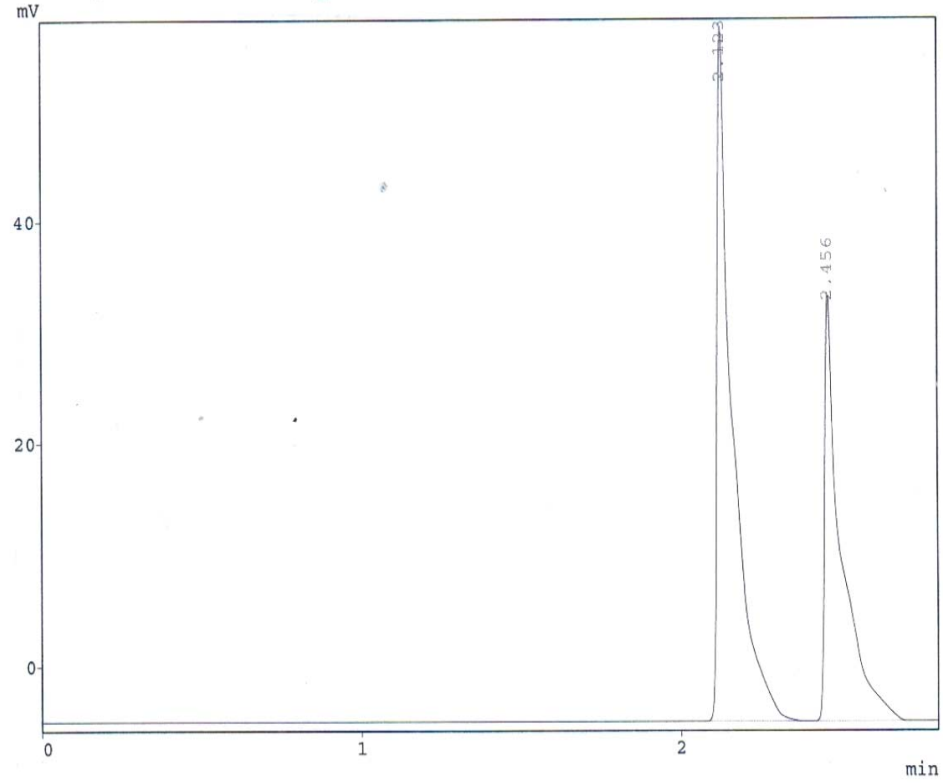


ตัวอย่างรูปกราฟ ที่ได้จากเครื่อง Gas chromatography (GC)

แสดงค่า สารละลายผลิตภัณฑ์ของอัตราการไหล 2 rpm

CLASS-GC10 Ver.=2.01 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=17 DATA=A_PROJ1.D17 01/01/01 01:22:20
Sample :
ID :
Dilution Factor: 1
Type : Unknown
Detector : FID
Operator :

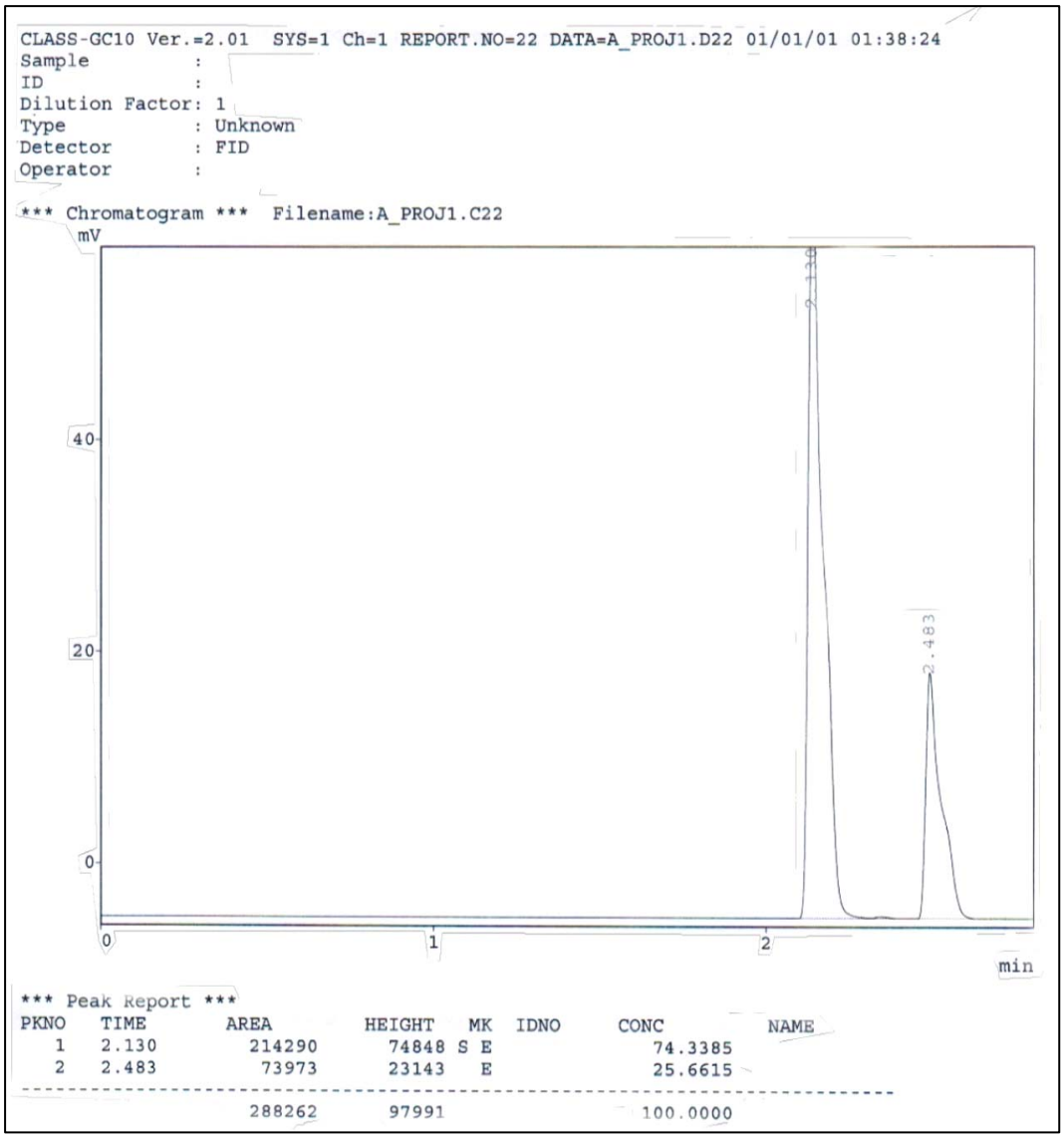
*** Chromatogram *** Filename:A_PROJ1.C17



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.123	207148	62512	E		60.1345	
2	2.456	137326	38432	E		39.8654	
		344475	100944			100.0000	

ตัวอย่างรูปกราฟ ที่ได้จากเครื่อง Gas chromatography (GC)
แสดงค่า สารละลายผลิตภัณฑ์ของอัตราการไหล 4 rpm



ตัวอย่างรูปกราฟ ที่ได้จากเครื่อง Gas chromatography (GC)

แสดงค่า สารละลายผลิตภัณฑ์ของอัตราการไหล 6 rpm