ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
เดกโทรส (Dextrose)	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งมาต้มให้สุกประมาณ 15 - 20 นาที จากนั้นกรองเอาแต่น้ำของมันฝรั่งที่ต้มแล้วผสมกับส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้วุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับส่วนผสม จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมกรดทาร์ทาริก 1 เปอร์เซ็นต์ ต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Malt Extract Medium (YM)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
มอลต์สกัด (Malt extract)	3	กรัม
แบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone)	5	กรัม
กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

*หมายเหตุ: ในอาหาร YM Broth ไม่ต้องเติมผงวุ้นลงไป

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	10	กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	20	กรัม
แบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone)	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract broth

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
แบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone)	5	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon fermentation test broth

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัม
แบคโต-เปปโตน (Bacto-peptone)	5	กรัม
กลูโคส (Glucose)	150	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดกับน้ำกลั่นให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

2. การเตรียมสไลด์สำหรับศึกษาเส้นแท้และเส้นใยเทียม

2.1 เทคนิค Dalmau plate

1. เทอาหารแข็งลงในจานเพาะเชื้อ ปล่อยให้อาหารแข็งและทิ้งไว้นาน 1 - 2 วัน เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
2. ทำการเพาะเชื้อบางๆ โดยวิธีขีดเป็นเส้นที่ใกล้ขอบด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อ
3. แบบจุด (Poin inoculation) สองแห่งที่ใกล้ขอบอีกด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อใช้กระจกปิดสไลด์ปราศจากเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟปิดทับที่บริเวณกึ่งกลางของรอยสตรีกและบนจุด 1 จุดไว้บ่มอุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเป็นเวลา 7-10 วัน
4. ตรวจผลดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 2 - 3 วัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ข
สารเคมี

1. การเตรียมสีย้อมLactophenol cotton blue stain

ฟีนอล คริสตรัล (Phenol crystal)	20	กรัม
กรดแลคติก (Lactic acid)	20	กรัม
กลีเซอรีน (Glycerin)	40	กรัม
คอทตอน บลู Cotton blue (poirrier's blue)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และกรองเก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิด

2. การเตรียมกรดทาร์ทาริก 1 เปอร์เซ็น

กรดทาร์ทาริก (Tataric acid)	10	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000	มิลลิลิตร

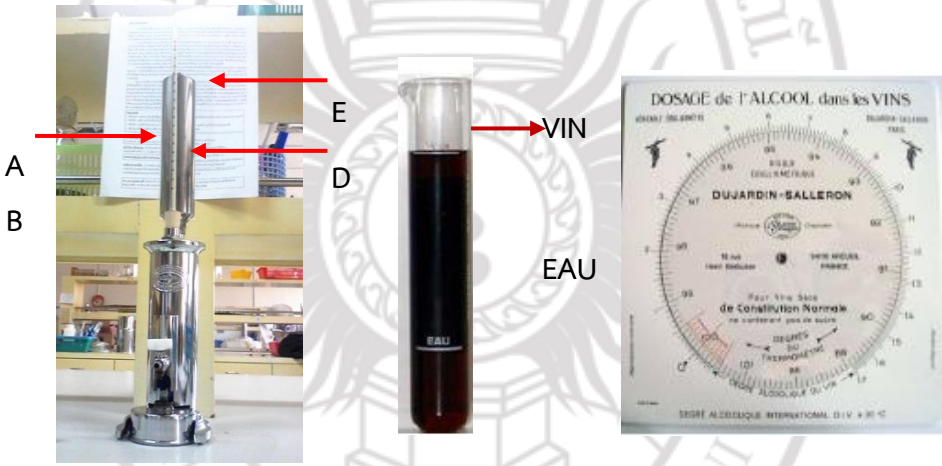
นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น และกรองเก็บไว้ในขวดที่มีฝาปิด

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ค
การวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยเครื่องมือ Ebulliometer

1. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล (%ปริมาตร/ปริมาตร)โดยใช้เครื่องมืออีบูลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer) (นฤมล โตอ่อน, 2549)

อีบูลิโอมิเตอร์เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดเอทานอลโดยการหาจุดเดือดของน้ำเทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างที่วัด เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วนต่อกัน ทรงกระบอกส่วนล่างบรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณเอทานอล ในช่อง A ใช้เสียบเทอร์โมมิเตอร์สำหรับอ่านอุณหภูมิ ทรงกระบอกส่วนบนมีจุด E ใช้บรรจุน้ำ เพื่อหล่อน้ำให้เย็น ทรงกระบอกส่วนบนและส่วนล่างต่อกันที่จุด D จุด F เป็นก๊อกที่ใช้ระบายสารละลายออกทิ้ง และจุด B เป็นปล่องสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียงซึ่งจะวางไว้ใต้ปล่องนี้ (ภาพที่ ค.1)



ภาพที่ ค.1 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) หลอดทดลอง และแผ่นอ่านค่าปริมาณเอทานอล

วิธีการทดลอง

การปรับค่า (Calibration) โดยการหาจุดเดือดของน้ำ

1. ตวงน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร หรือใช้หลอดที่มากับเครื่องมือ โดยตวงให้ถึง “EAU” ลงในช่องบรรจุสาร A ในขณะเดียวกันเติมน้ำเย็นลงไปในส่วนของชุดควบแน่น E

2. นำเทอร์โมมิเตอร์ใส่ลงไปไปในตำแหน่งสำหรับอ่านอุณหภูมิ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ต้มจนเดือด

3. อ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์เมื่อมีค่าคงที่ประมาณ 15-30 วินาที

4. จุดเดือดของน้ำที่อ่านได้ นำค่าที่ได้ไปตั้งในแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์เอทานอล (Dosage de l’ Alcohol dans les VINS) โดยตั้งจุดเดือดของน้ำที่อ่านได้ (ดูสเกลด้านใน)ให้ตรงกับ 0.0 % เอทานอล (ดูสเกลด้านนอก) หรือตำแหน่งที่มีเครื่องหมาย

การปรับค่า (Calibration) โดยการหาจุดเดือดของสารตัวอย่าง

1. ตวงสารตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร หรือใช้หลอดที่มากับเครื่องมือ โดยตวงให้ถึง “VIN” ลงในช่องบรรจุสาร A ในขณะเดียวกันเติมน้ำเย็นลงไปในส่วนชองชุดควบแน่น E

2. นำเทอร์โมมิเตอร์ใส่ลงไปในตำแหน่งสำหรับอ่านอุณหภูมิ จุดตะเกียงแอลกอฮอล์ต้มจนเดือด

3. อ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์เมื่อมีค่าคงที่ประมาณ 15-30 วินาที

4. อ่านเปอร์เซ็นต์เอทานอลของสารตัวอย่าง (ดูที่สเกลด้านนอก) ที่ตรงกับจุดเดือดของสารตัวอย่าง (ดูสเกลด้านใน) จากแผ่นอ่านเปอร์เซนต์เอทานอล

การคำนวณเทียบจากแผ่นสเกล

โดยให้จุดเดือดของน้ำกลั่นมาอยู่ที่ตำแหน่ง 0 ของแผ่นเปรียบเทียบอุณหภูมิ (Degree Alcoolique Du Vin) จากจุดเดือดของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ให้เทียบสเกลด้านใน (Degres Du Thermometer) แล้วอ่านค่าปริมาณเอทานอล (ร้อยละ โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ที่สเกลด้านนอก ดังภาพที่ ค.1

2. การคำนวณหาปริมาณเอทานอลจากเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% v/v) เป็นปริมาณเอทานอลโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (g/l) (ภัททิยา ตระกูลสว่าง, 2530)

สมมติปริมาณเอทานอลที่วัดได้จากวิธีการวัดด้วยเครื่องมือ Ebulliometer ได้ X% (โดยปริมาตร) นั่นคือ สารตัวอย่างปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีปริมาตรของเอทานอล = X มิลลิลิตร

ถ้าสารตัวอย่างปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาตรของเอทานอล $= \frac{X \times 1{,}000}{100}$

$= X \times 10$ มิลลิลิตร/ลิตร

จากสูตร ความควบแน่น $= \frac{\text{มวล}}{\text{ปริมาตร}}$

หมายเหตุ *ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.79 กรัม/มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น ปริมาณเอทานอล = $X \times 10 \times 0.79$ กรัม/มิมลิลิต

3. การคำนวณปริมาณเอทานอลจากน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัม/ลิตร) เป็นปริมาณผลผลิต (yield) (ภัททิยา ตระกูลสว่าง, 2530)

$$\text{Yield} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลที่ได้ (กรัม/ลิตร)}}{\text{ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัม/ลิตร)}}$$

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

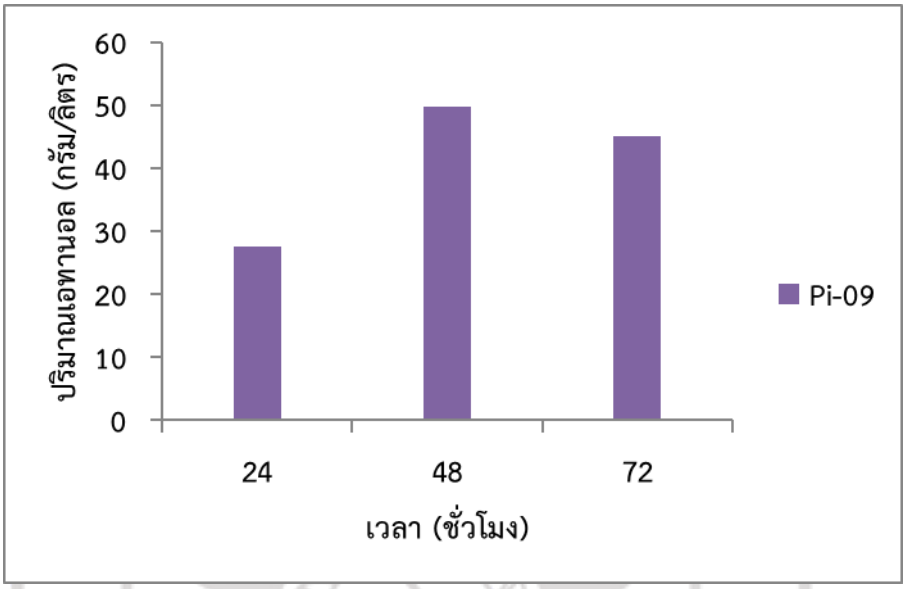
ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากผลการทดลอง

ตารางที่ ง.1 ตารางเปรียบเทียบผลทดสอบปริมาณเอทานอลของไอโซเลท Pi-09, Pi-11, Pa-01, Pa-04, Ba-01 และ Ba-07 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

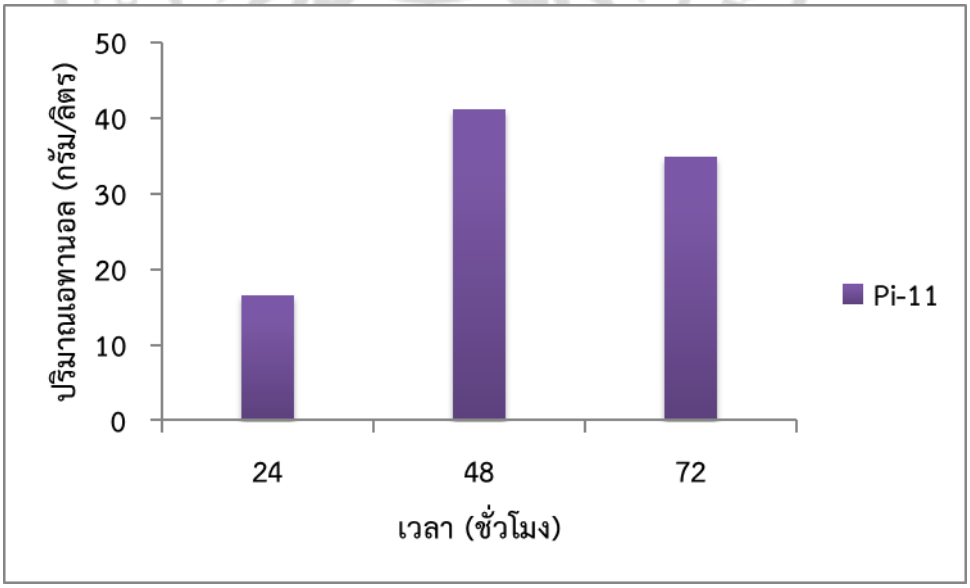
ไอโซเลท	ชั่วโมง	ปริมาณเอทานอล % (ปริมาตร/ปริมาตร)		ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	ร้อยละปริมาณผลผลิตทางทฤษฎี (% yield)
		ซ้ำครั้งที่ 1	ซ้ำครั้งที่ 2			
Pi-09	24	3.2	3.8	3.5	27.65	0.25
	48	6.1	6.5	6.3	49.77	0.45
	72	5.8	5.5	5.7	45.03	0.40
Pi-11	24	1.7	2.6	2.1	16.59	0.15
	48	5.5	5.0	5.2	41.08	0.12
	72	4.1	4.7	4.4	34.79	0.31
Pa-01	24	2.6	1.5	2.0	15.80	0.14
	48	5.1	5.0	5.0	39.50	0.35
	72	4.4	4.4	4.4	34.76	0.31
Pa-04	24	6.4	6.6	6.5	51.35	0.46
	48	5.8	5.8	5.8	45.82	0.41
	72	5.1	4.9	5.0	39.50	0.35
Ba-01	24	6.7	7.0	6.8	53.72	0.48
	48	5.6	5.9	5.7	45.03	0.40
	72	5.1	5.1	5.1	40.29	0.36
Ba-07	24	6.7	6.5	6.6	52.14	0.47
	48	5.4	5.7	5.5	43.45	0.39
	72	5.1	4.8	4.9	38.71	0.35

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

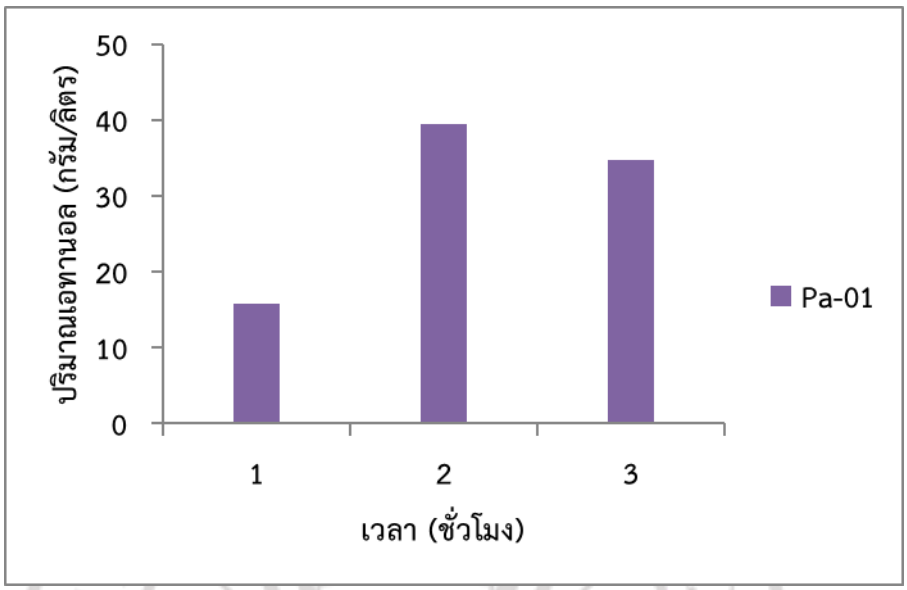
ภาคผนวก จ
แผนภูมิปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้



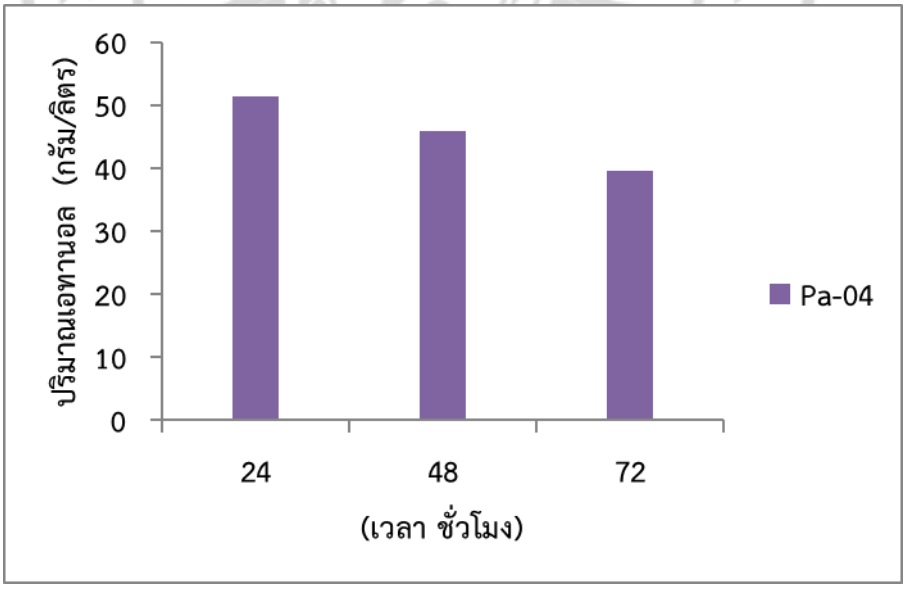
ภาพที่ จ.1 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Pi-09 โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



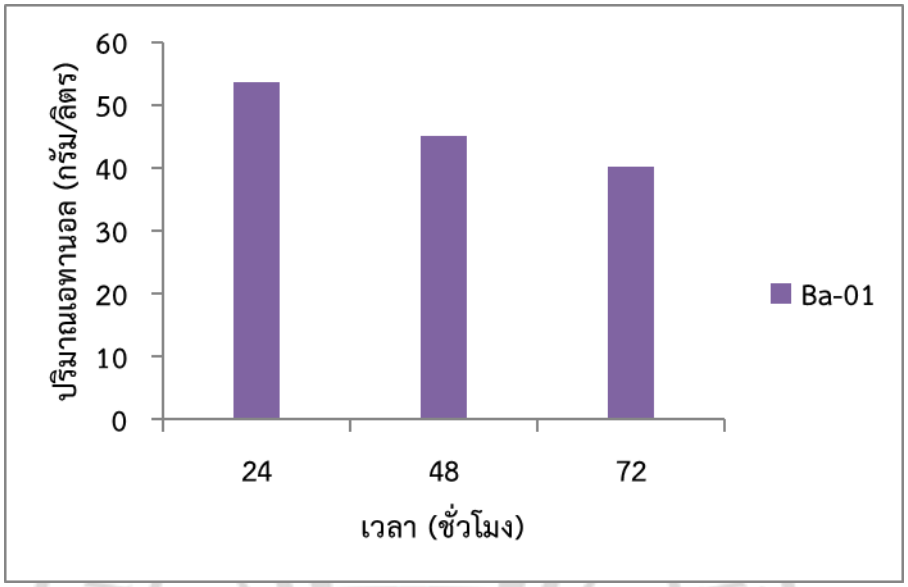
ภาพที่ จ.2 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Pi-11 โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



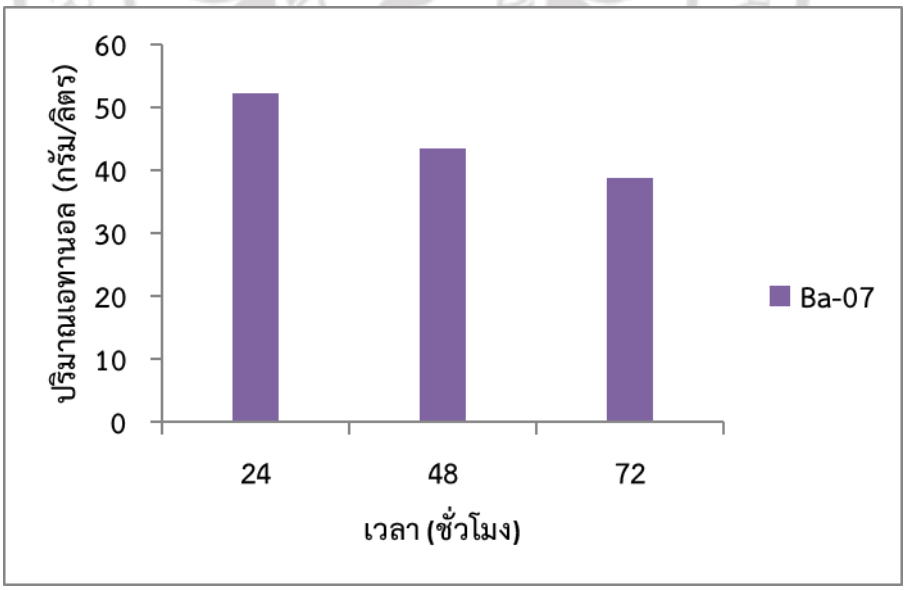
ภาพที่ จ.3 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Pa-01 โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ จ.4 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Pa-04 โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ จ.5 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Ba-01โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ จ.6 การหมักเอทานอลของไอโซเลท Ba-07 โดยใช้อาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส