ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

ผลการทดลองการผลิตเอทานอลแบบแบตซ์และเฟดแบตซ์

6-1 ผลการผลิตเอทานอลแบบแบตซ์และเฟดแบตซ์เมื่อขยายขนาดการผลิตเป็น 3 ลิตร

Experiment	V	P	S	Yp/s	Yx/s	E_T	S_{int}	S_{total}	S_{used}	$\%S_{used}$	Q_p
C	8.404±0.15	65.98±1.19	60.114±6.75	0.473±0.02	0.038±0.00	92.63±3.48	199.67	199.67	139.56	69.90	0.9164
50	6.354±0.31	49.89±2.43	74.542±6.28	0.455±0.02	0.067±0.00	88.98±3.61	184.36	184.36	109.82	59.57	0.6923
100	7.995±0.17	62.77±1.36	66.482±2.30	0.577±0.00	0.068±0.00	113.02±0.23	175.37	175.37	108.68	61.97	0.8713
200	10.107±0.86	79.35±6.77	55.514±3.59	0.512±0.03	0.040±0.00	100.07±6.41	210.56	210.56	155.04	73.63	1.1028
400	9.108±0.29	71.51±2.25	72.542±3.09	0.431±0.01	0.029±0.00	84.28±1.27	238.56	238.56	166.02	69.59	1.0762
$\mu = \mu_{max}$	8.811±0.23	69.18±1.78	43.495±2.14	0.467±0.01	0.049±0.00	91.35±1.05	125.92	191.68	148.19	77.31	0.9603
$\mu = 2/3\mu_{max}$	8.832±0.20	69.34±1.56	70.994±4.72	0.485±0.01	0.045±0.00	94.46±1.23	140.69	214.68	143.69	66.93	0.9630
$\mu = 1/3\mu_{max}$	8.359±0.04	65.63±0.33	64.556±4.26	0.507±0.01	0.051±0.00	99.41±2.79	135.59	193.83	129.27	66.69	0.9116

V คือ ความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (% (v/v))

P คือ ความเข้มข้นเอทานอลโดยน้ำหนัก กรัมต่อลิตร (g/l)

S คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการหมัก กรัมต่อลิตร (g/l)

Yp/s คือ ผลผลิตเอทานอล มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมต่อลิตร (g/g/l)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$Y_{x/s}$ คือ ผลผลิตมวลเซลล์ มีหน่วยเป็นกรัมต่อกรัมต่อลิตร (g/g/l)

E_T คือ เปอร์เซ็นต์เอทานอลที่ได้เทียบกับทฤษฎี (%)

S_{int} คือ ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก กรัมต่อลิตร (g/l)

S_{tota} คือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในการหมัก กรัมต่อลิตร (g/l)

S_{used} คือ ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปในการหมัก กรัมต่อลิตร (g/l)

$\%S_{used}$ คือ เปอร์เซ็นต์น้ำตาลที่ถูกใช้ไปในการหมัก (%)

Q_p คือ อัตราการผลิตเอทานอลเมื่อสิ้นสุดการหมัก (72 ชั่วโมง) กรัมต่อกรัมต่อลิตร (g/g/l)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2.1. แป้งถั่วเหลือง (Soy Flour, SF)

คุณค่าทางโภชนาการของนมถั่วเหลืองแท้ 100 % ตรา ดอยคำ

ส่วนประกอบ	ต่อ 100 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลอรี่)	471.0
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี่)	190.0
ไขมันทั้งหมด (กรัม)	21.1
ไขมันอิ่มตัว (กรัม)	3.4
โปรตีน (N x 5.71) (กรัม)	34.2
คาร์โบไฮเดรต	
(รวมใยอาหาร) (กรัม)	36.0
ใยอาหาร (กรัม)	17.5
น้ำตาล (กรัม)	5.5
โซเดียม (มิลลิกรัม)	19.5
B1(มิลลิกรัม)	0.01
B2 (มิลลิกรัม)	0.02
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	272.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	5.68

2.2. Yeast Peptone Dextrose (YPD)

ส่วนประกอบ

Yeast extract	1	%
Peptone	2	%
Dextrose	2	%

pH 5.0±0.1

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3. Peptone Dextrose Agar (PDA)

ส่วนประกอบ

Potato extract	4	g/l
Dextrose	20	g/l
Agar	15	g/l

pH 5.6 $\pm$ 0.2

นำส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.4. การเตรียมน้ำสกัดจากแป้งถั่วเหลือง

2.4.1 ละลายแป้งถั่งเหลืองในน้ำกลั่นในอัตราส่วนแป้งถั่ว 100 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการกวนจนแป้งละลาย

2.4.2 นำน้ำแป้งถั่วเหลืองที่ละลายแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ลงในขวดที่สะอาด แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.5. การย่อยแป้งมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาล

การย่อยแป้งในการทดลองนี้จะนำมาจากการวิจัยของ ฉวีวรรณ สว่างวัน (2548) โดยมีสภาวะในการย่อยดังนี้

การย่อยสลายครั้งแรก (Liquefaction) จะใช้เอนไซม์เทอร์มามิล (Termamyl) เข้มข้น 0.5 % (v/v) ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 30 พีพีเอ็ม ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 30 % (w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที ได้ปริมาณน้ำตาลเข้มข้น 38 กรัมต่อลิตร ได้ค่า DE เท่ากับ 28

การย่อยสลายขั้นสุดท้าย (Saccharifcation) โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้น 0.1 % (v/v) คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ได้ปริมาณน้ำตาลเข้มข้นสูงสุด 253 กรัมต่อลิตร ได้ค่า DE เท่ากับ 98.5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar)

1.1 หลักการ

น้ำตาลรีดิวซ์สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลาย 3,5 ไดไนโตรซาลิซัยเลต (3,5 dinitrosalicylate)ในสภาวะเป็นเบสร้อนได้สารละลายสีส้มแดง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณโดยการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1.2 สารเคมีและวิธีเตรียม

1.2.1 ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หนัก 16 กรัม ในน้ำ 200 มิลลิลิตร และเติม 3,5 ไดไนโตรซาลิซัยเลต หนัก 10 กรัม ลงไป อุ่นให้ความร้อนและคนเพื่อเพิ่มการละลายให้เร็วขึ้น

1.2.2 ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate) หนัก 300 กรัม และโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ (Sodium Metabisulfite) หนัก 8 กรัมลงในน้ำ 500 มิลลิลิตร

1.2.3 ผสมสารละลายทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.3 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.3.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบแต่ละหลอด เติม 3,5 ไดไนโตรซาลิซัยเลต รีเอเจนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันทั่ว

1.3.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำหลอดมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันทั่ว แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับแบลงค์ ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสาละลายกลูโคส

1.4 วิธีวิเคราะห์

1.4.1 ปิเปตสารละลายน้ำตาลที่ได้จาการย่อยแป้ง หรือที่เหลือจากการหมักมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติม 3,5 ไดไนโตรซาลิซัยเลต รีเอเจนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันทั่ว

1.4.2 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำหลอดมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันทั่ว แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับแบลงค์ ที่ใช้น้ำกลั่นแทนสาละลายกลูโคส วิเคราะห์ปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

2. การวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องมือ Ebulliometer

2.1 หลักการ

เป็นการวัดอุณหภูมิของจุดเดือดที่แตกต่างกันของน้ำ กับน้ำที่มีแอลกอฮอล์ปน ซึ่งน้ำที่มีแอลกอฮอล์ปนจะมีจุดเดือดต่ำกว่า

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 เทน้ำกลั่นลงในหลอดแก้วตวงจนถึงขีด EAU แล้วนำไปเทใส่ลงในช่องเติมตัวอย่างของเครื่องมือ (ช่องที่ไว้ใส่ปรอทวัดอุณหภูมิ) และนำเอาปรอทมาใส่ในช่องเติมตัวอย่าง และเติมน้ำลงในส่วนของหอกลั่นของเครื่องมือ จากนั้นทำการต้มจนน้ำเดือดคงที่ (น้ำเดือดที่อุณหภูมิคงที่ นานประมาณ 5 นาที)

2.2.2 เมื่อน้ำเดือดคงที่แล้วให้ดูอุณหภูมิที่ปรอท และทำการปรับตำแหน่งค่าอุณหภูมิ (Degres du Thermometer) ของแผ่นแสดงอุณหภูมิ (Dosage del'Alcool Dans les Vins) ที่อ่านได้ให้ตรงกับตำแหน่งเลขศูนย์ของค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (Degre Alcoolique du Vin)

2.2.3 ทำการตวงน้ำหมักลงในหลอดแก้วจึงถึงขีด VIN แล้วนำไปเติมลงในช่องเติมตัวอย่างและต้มจนน้ำเดือดอีกครั้ง ทำการอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้จากปรอท และอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้เทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์บนแผ่นแสดงอุณหภูมิ ก็จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ออกมา

3. การวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องมือ Gas Chromatography

3.1 หลักการ

เป็นการแยกสารที่เราต้องการออกมาโดยอาศัยความสามารถในการละลายที่ไม่เท่ากันใน Stationary Phase และ Mobile Phase สารที่ละลายใน Mobile Phase ได้ดีจะถูกแยกออกมากก่อนสารที่ละลายใน Stationary Phase ได้ดี

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

แก๊สโครมาโตการฟี (Gas Chromatography) รุ่น UNICAM Pro GC

แคพิลารี่ คอลัม โครมาโตรการฟี (Capillary Column) รุ่น AT™-AQUAWAX

แก๊สไนโตรเจน (N_2)

แก๊สฮีเลี่ยม (He)

Absolute Ethanol (99.7-100%)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Absolute Butanol

GC Vial

3.3 วิธีเตรียมกราฟมาตรฐาน

3.3.1 ทำการตั้งค่าของเครื่อง Gas Chromatography ดังนี้

Oven Temp.	80	องศาเซลเซียส
Injection Temp.	250	องศาเซลเซียส
Detector Temp.	260	องศาเซลเซียส
Split	109	มิลลิลิตรต่อนาที
Pressure	20	ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi.)
Injection Volume	0.4	ไมโครลิตร
Standard Volume	0.3	ไมโครลิตร

3.3.2 เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (Absolute Ethanol) ความเข้มข้น 6, 9, 12 และ 15 % (v/v) ใส่หลอดตัวอย่าง(GC vial) เตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน (Absolute Butanol) เข้มข้น 10 % (v/v) ใส่ในหลอดมาตรฐาน (Standard Vial)

3.3.3 ทำการสั่งงานให้ดูดตัวอย่างแบบอัตโนมัติ ด้วยวิธีให้ดูดสารละลายบิวทานอลมาตรฐานปริมาตร 3 ไมโครลิตร และสารละลายเอทานอลมาตรฐานปริมตร 4 ไมโครลิตร ให้อยู่ในเข็มฉีด (Standard add to Syringe).แล้วฉีดลงไปในช่อง injection เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2.5 นาที เอทานอล และบิวทานอลก็จะแยกออกมาปรากฏเป็นพีค (Peak) บนโครมาโตแกรม (Chromatograms) โดยพีคของเอทานอลจะแยกออกมาก่อนพีคของบิวทานอล

3.3.4 ทำการคำนวณพื้นที่ได้กราฟของพีคเอทานอลของสารละลายเอทานอลมาตรฐาน และบิวทานอลของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานโดยใช้โปรแกรมของเครื่องโครมาโตกราฟี เทียบเป็นค่าอัตราส่วน (Peak Aria Ratio; PAR) ระหว่างพีคของเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับบิวทานอลที่ความเข้มข้น 10 % (v/v)

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 ทำการตั้งค่าเครื่องเหมือนข้อ 3.2.1

3.4.2 ทำการสั่งการดูดตัวอย่างเหมือนข้อ 3.2.3 แต่เปลี่ยนจากดูดสารละลายเอทานอลมาตรฐานมาเป็นดูดน้ำหมักที่ได้จากการทดลองแทน

3.4.3 ทำการคำนวณพื้นที่ได้กราฟของพีคเอทานอลที่ได้จากน้ำหมักและบิวทานอลจากสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน เปรียบเทียบเป็นอัตราส่วน (Peak Aria Ratio; PAR) ก็จะได้ค่าความเข้มข้นเอทานอลโดยปริมาตร (V, % (v/v))

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. วิธีการหาน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง (Cell Dry Weight)

4.1 นำหลอดพลาสติกขนาดเล็กมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำมาใส่ใน Desiccater ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมงนำหลอดพลาสติกขนาดเล็กที่มีฝาปิดมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกค่าไว้ (น้ำหนักหลอดก่อนอบ)

4.2 ทำการปิเปตน้ำหมักที่ได้จากการทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติกที่ทราบค่าน้ำหนักแล้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3 นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำหลอดพลาสติกขนาดเล็กไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำมาใส่ใน Desicator ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และบันทึกค่าไว้ (น้ำหนักหลอดหลังอบ)

4.4 ทำการคำนวณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง โดยนำน้ำหนักหลอดหลังอบ มาลบกับน้ำหนักหลอดก่อนอบ ก็จะได้น้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งกรัมต่อลิตร (g/l)

5. วิธีการหาอัตราการเจริญจำเพาะในสภาวะ Static

5.1 วิธีการดำเนินการ

5.1.1 นำยีสต์ตั้งต้นที่เก็บไว้ในสภาวะแช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการละลาย จากนั้นถ่ายยีสต์ลงไปในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Peptone Dextrose Broth (YPD) บรรจุอยู่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 175 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง

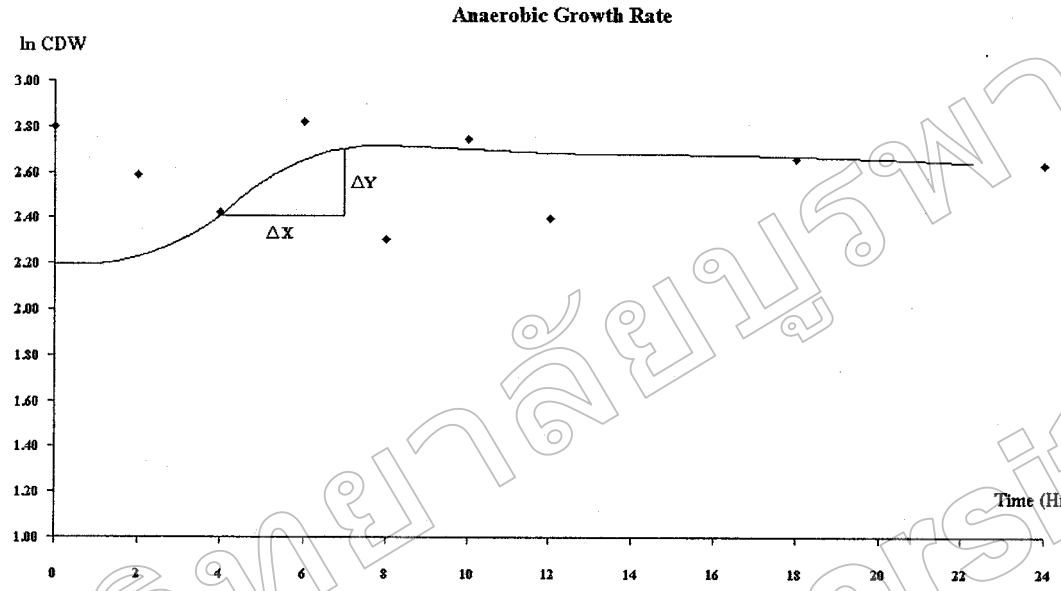
5.1.2. ถ่ายยีสต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (SCS) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ได้ทำการปรับค่าพีเอช (pH) เป็น 5.0±0.1 นำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีการเขย่า

5.1.3 ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมัก ปริมาณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง และค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร

5.1.4 นำค่าปริมาณน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งใส่ค่า Natural Logarithm นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งกับเวลา และทำการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) ในสภาวะ Static จากความชัน (Slope) ของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งกับเวลาโดยได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะในสภาวะ Static (μ_{max}) ท่ากับ 0.067

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2 ผลการทดลอง



ภาพที่ 6-1 การหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(μ_{max}) จากค่าความชัน (Slope) ของกราฟ

จากภาพที่ 6-1 ทำการหาค่าความชัน (Slope) จากค่า $\Delta Y/\Delta X$ จะได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{max}) เท่ากับ 0.067

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค
การจัดจำแนกยีสต์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมี

95% Ethanol

0.5 M EDTA, pH 8.0

20% SDS

Phenol solution

Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25: 24: 1)

7.5 M Ammonium acetate, pH 4.8

Ethanol (70% และ absolute; chilled)

Phosphate buffer pH 7.0

50X Tris-acetate-electrophoresis (TAE) buffer

CTAB extraction buffer (pH 8.4) stock solution

2. บัฟเฟอร์

TE buffer, pH 8.0 (10 mM Tris-Cl, pH 8.0 +1 mM EDTA, pH 8.0)

TES buffer (25% sucrose in 1X TE buffer)

TAE buffer

3. เอนไซม์

Taq DNA polymerase (Invitrogen)

4. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker)

Hyperladder I (Bioline)

5. ไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อยีน 18S rRNA (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) ดังแสดงในตารางที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6-2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990)

ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'..... 3')	ค่า Tm (°C)	ดีเอ็นเอ เป้าหมาย	การใช้งาน
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	56	18S rRNA	PCR & Sequencing
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	57	18S rRNA	Sequencing
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	65	18S rRNA	PCR & Sequencing

อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler รุ่น Biometra®)

เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)

Rotary shaker

โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

BioEdit (Department of microbiology North Carolina State University)

Blastn (National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine, 2004)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์

1.1 เพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลทในอาหาร YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน

1.2 ทำการดูดตัวอย่างยีสต์ด้วยหลอดหยด มาหยดลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วย Cover Slip แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า แล้วจดบันทึกสิ่งที่เห็น

2. การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์

(ดัดแปลงจากวิธีของ O'Donnell et al., 1997)

2.1 นำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไวในอาหาร YPD ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 175 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS buffer 2 ครั้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2 นำเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน Eppendorf tube จากนั้นเติม CTAB buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นผสม (vortex) เป็นเวลา 5 วินาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.3 ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนของสารละลายที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงใส่ใน Eppendorf tube หลอดใหม่

2.4 เติม phenol และ chloroform-isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่า ผสมโดยการกลับหลอดไปมา (Inversion)

2.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนของสารละลายที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงใส่ลงใน Eppendorf tube หลอดใหม่

2.6 เติม 7.5 M Ammonium Acetate ปริมาตร 0.5 เท่า และ 95 % ethanolปริมาตร 2.5 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำหลอด Eppendorf tube ไปเก็บที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.7 ปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส นาน 15 นาที

2.8 ล้างดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.9 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นเก็บตะกอนดีเอ็นเอและทำให้แห้ง

2.10 ละลายดีเอ็นเอโดยการเติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3. การเพิ่มขยายยีน 18S rRNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับองค์ประกอบต่าง ๆ เพื่อเพิ่มขยายยีน 18S rRNA ดังแสดงในตารางที่ 6.2

3.2 นำหลอดปฏิกิริยาที่เตรียมได้ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งปฏิกิริยา PCR ทำทั้งหมด 35 รอบ โดยมีสภาวะที่ใช้แสดงดังตารางที่ 6-3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 6-3 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	38.4	-
10X PCR buffer	5.0	1 เท่า
50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$	1.5	1.5 มิลลิโมลาร์
10 มิลลิโมลาร์ dNTP mix	1.0	0.2 มิลลิโมลาร์
ไพร์เมอร์ (Forward primer) (30 ไมโครโมลาร์)	0.8	0.5 ไมโครโมลาร์
ไพร์เมอร์ (Reverse primer) (30 ไมโครโมลาร์)	0.8	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอแม่แบบ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2.0	100 นาโนกรัม
Taq DNA polymerase	0.5	2.5 ยูนิต
ปริมาตรรวม	50.0	-

ตารางที่ 6-3 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ของยีน 18S rRNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลาที่ใช้ต่อรอบ	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	1
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	35
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	35
Final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	1

3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยนำสารละลายในหลอดปฏิกิริยาจากข้อ 3.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาทำอิเลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล (Agarose Gel) 1 % (ข้อ 1.3) ตรวจผลจากเครื่อง UV Transilluminator เปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน Hyperladder Marker

4. อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis)

4.1 เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน TAE buffer นำไปต้มในไมโครเวฟจนอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ใส่ Ethidium

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันและเทลงถาดที่เตรียมไว้

4.2 เมื่ออะกาโรสเจลแข็ง ดึงหวีออกจากเจล และนำเจลใส่ลงใน Electrophoresis Chamber หลังจากนั้นเท TAE Buffer ให้ท่วมเจล

4.3 ผสมดีเอ็นเอกับ Loading Buffer และนำมาหยอดใส่ลงในช่องที่อยู่บนเจล

4.4 เปิดกระแสไฟฟ้า โดยให้มีความต่างศักย์เป็น 80 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที

4.5 ตรวจผลด้วยเครื่อง UV Transilluminator บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพ

5. การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

ใช้ UltraClean™ 15 DNA Purification Kit ในการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ภายหลังจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 ตัดอะกาโรสเจลตรงตำแหน่งของผลิตภัณฑ์ PCR บนชิ้นวุ้นด้วยใบมีดที่สะอาดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตบนเครื่อง UV Transilluminator หลังจากนั้นนำชิ้นวุ้นที่ได้ใส่ใน Eppendorf Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.2 เติม ULTRA SALT ปริมาตร 3 เท่า (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นช่วง ๆ เพื่อผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จนกระทั่งอะกาโรสหลอมจนหมด

5.3 แขวนลอย ULTRA BIND ให้เป็นเนื้อเดียว โดยการใช้เครื่องปั่นผสม ที่ความเร็วสูงสุด (ประมาณ 2,500 รอบต่อนาที) โดยขณะทำให้วางหลอดในตำแหน่งแนวระนาบ (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที)

5.4 เติม ULTRA BIND 5 ไมโครลิตร บวก 1 ไมโครลิตร (สำหรับการ Recover ดีเอ็นเอปริมาณ 0-1 ไมโครกรัม) ลงในสารละลายดีเอ็นเอในข้อ 5.3 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ในระหว่างนี้ให้ผสมตัวอย่างให้เข้ากันเป็นช่วง ๆ (โดยใช้นิ้วเคาะข้างหลอด)

5.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที แยกส่วนใสออก และแขวนลอยตะกอนโดยการเติม ULTRA WASH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นผสม นาน 5-10 วินาที

5.5 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 วินาที ค่อย ๆ ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.6 แขวนลอยตะกอนในน้ำกลั่น หรือ TE ในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร ULTRA BIND silica ที่ใช้ในข้อที่ 5.4 และใช้ปิเปตดูดสารละลายขึ้นลงจนเป็นเนื้อเดียวกัน (ห้าม Vortex) บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

5.7 ดูดส่วนของสารละลายใส่ eppendorf tube หลอดใหม่ (ทำทันที หากว่ามี Silica ขาว ๆ ติดมาด้วยให้ปั่นหวี่ยงใหม่)

5.8 เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ –20 องศาเซลเซียส

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ (Macrogen Inc., Floor 28 Yongondang Chongno-Go, Seoul 110-799 Korea) (http://www.macrogen.com/eng/sequencing/extension.jsp)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

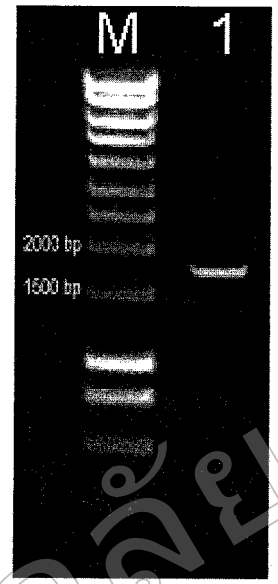
นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA มาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ GenBank จาก National Center for Biotechnology Information Server (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)

ผลการทดลอง

การเพิ่มขยายยีน 18S rRNA

การเพิ่มขยายยีน 18S rRNA จากยีสต์ไอโซเลท TC6 โดยใช้ไพร์เมอร์ NS1 และ NS8 ส่วนการเพิ่มขยายยีน 18S rRNA จาก Ssp5 ใช้ไพร์เมอร์ NS3 และ NS8 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากแต่ละไอโซเลทมีขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส ยกเว้น Ssp5 ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ประมาณ 1,500 กิโลเบส (ภาพที่ 6-2) ซึ่งตรงตามที่คาดไว้จากการใช้ไพร์เมอร์คู่ดังกล่าวข้างต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

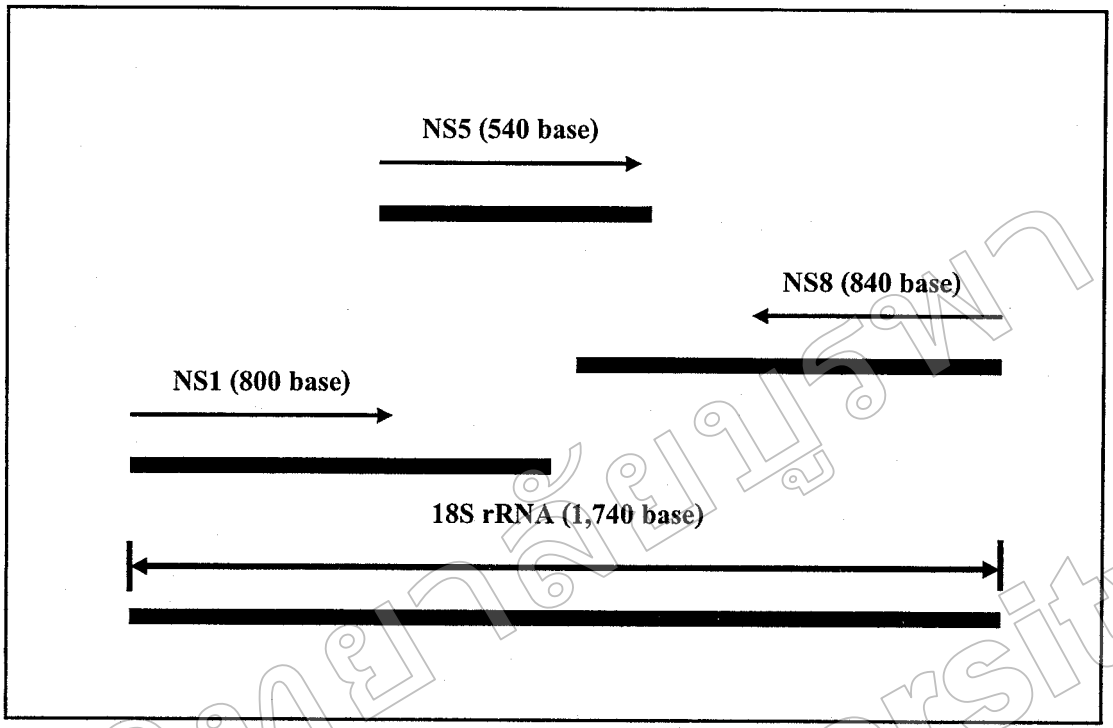


ภาพที่ 6-2 ยีน 18S rRNA ของยีสต์ไอโซเลท TC6 ซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR เลนส์ M: ดีเอ็นเอมาตรฐาน Hyperladder marker, เลนส์ 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ ยีสต์ไอโซเลท TC6

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของยีสต์ไอโซเลท TC6 ที่วิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาการใช้ไพร์เมอร์ NS1 และ NS8 สามารถอ่านผลได้ 800 และ 840 คู่เบส ตามลำดับ ในที่นี้จำเป็นต้องใช้ไพร์เมอร์ส่วนใน (Internal Primer) คือ NS5 เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนในของยีน 18S rRNA โดยสามารถอ่านผลได้ 540 คู่เบส ซึ่งมีส่วนที่เหลื่อมซ้อนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก NS1 และ NS8 เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมารวมสร้างเป็น Contiq ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความยาว 1,740 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 6-2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดแสดงดังภาพที่ 6-3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 6-3 การสร้าง Contiq จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6 ซึ่งวิเคราะห์ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ NS1, NS8 และ NS5

1 ATTTGCTTGT CTCAAAGATT AAGCCATGCA TGTCTAAGTG ATAAGCAATT TATACAGTGA
61 AACTGCGAAT GGCTCATTAA ATCAGTTATC GTTTATTTGA TAGTTCCTTT ACTACATGGT
121 ATAACTGTGG TAATTCTAGA GCTAATACAT GCTTAAAATC TCGACCCTTT GGAAGAGATG
181 TATTTATTAG ATAAAAAATC AATGTCTTCG GACTCTTTGA TGATTCATAA TAACTTTTCG
241 AATCGCATGG CCTTGTGCTG GCGATGGTTC ATTCAAATTT CTGCCCTATC AACTTTCGAT
301 GGTAGGATAG TGGCCTACCA TGGTTTCAAC GGGTAACGGG GAATAAGGGT TCGATTCCGG
361 AGAGGGAGCC TGAGAAACGG CTACCACATC CAAGGAAGGC AGCAGGCGCG CAAATTACCC
421 AATCCTAATT CAAGGAGGTA GTGACAATAA ATAACGATAC AGGGCCCATT CGGGTCTTGT
481 AATTGGAATG AGTACAATGT AAATACCTTA ACGAGGAACA ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG
541 CCAGCAGCCG CGGTAATTCC AGCTCCAATA GCGTATATTA AAGTTGTTGC AGTTAAAAAG
601 CTCGTAGTTG AACTTTGGGC CCGGTTGGCC GGTCCGATTT TTCCGTGTAC TGGATTTCCA
661 ACGGGGCCTT TCCTTCTGGC TAACCTTGAG TCCTTGTGGC TCTTGGCGAA CCAGGACTTT
721 TACTTTGAAA AAATTAGAGT GTTCAAAGCA GGCGTATTGC TCGAATATAT TAGCATGGAA
781 TAATAGAATA GGACGTTTGG TTCTATTTTG TTGGTTTCTA GGCCCATCGT AATGATTAAT
841 AGGGACGGTC GGGGGGCACT CAGTATTCAA TTGTCAGAGG TGAAATTCTT GGATTTATTG
901 AAGACTAACT ACTGCGAAAG CATTCGCCAA GGACGTTTTC ATTAACTCAA GAACGAAAGT
961 TAGGGGATCG AAGATGATCA GATACCGTCG TAGTCTTAAC CCATAACTAT GCCGACTAGG
1021 GATCGGGTGG TGTTTTTTTA ATGACCCACT GGGCACCTTA CGAGAAATCA AAGTCTTTGG
1081 GTTCTGGGGG GAGTATGGTC GCAAGGCTGA AACTTAAAGG AATTGACGGA AGGGCACCAC
1141 CAGGAGTGGA GCCTGCGGCT TAATTTGACT CAACACGGGG AAACTCACCA GGTCCAGACA
1201 CAATAAGGAT TGACAGATTG AGAGCTCTTT CTTGATTTTG TGGGTGGTGG TGCATGGCCG
1261 TTCTTAGTTG GTGGAGTGAT TTGTCTGCTT AATTGCGATA ACGAACGAGA CCTTAACCTA
1321 CTAAATAGTG GTGCTAGCAT TTGCTGGTTA TCCACTTCTT AGAGGGACTA TCGGTTTCAA

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1381 GCCGATGGAA GTTTGAGGCA ATAACAGGTC TGTGATGCCC TTAGACGTTC TGGGCCGCAC
1441 GCGCGCTACA CTGACGGAGC CAGCGAGTCT AACCTTGGCC GAGAGGTCTT GGTAATCTTG
1501 TGAAACTCCG TCGTGCTGGG GATAGAGCAT TGTAATTATT GCTCTTCAAC GAGGAATTCC
1561 TAGTAAGCGC AAGTCATCAG CTTGCGTTGA TTACGTCCCT GCCCTTTGTA CACACCGCCC
1621 GTCGCTAGTA CCGATTGAAT GGCTTAGTGA GGCCTCAGGA TCTGCTTAGA GAAGGGGGCA
1681 ACTCCATCTC AGAGCGGAGA ATTTGGACAA ACTTGGTCAT TTAGAGGAAC TAAAAGTCGT

ภาพที่ 6-4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ T6 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov.com) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6 มีความคล้ายคลึงประมาณ 99% กับ *Saccharomyces cerevisiae* S12 AY218890 ดังแสดงในตารางที่ 6-4

ตารางที่ 6-5 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อ TC6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank*

Organism	Accession Number*	% Similarity
Saccharomyces cerevisiae S12	AY218890	99
Saccharomyces cerevisiae S14	AY218889	98
Saccharomyces cerevisiae	Z755787	98

* GenBank accession number (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

(ดัดแปลงจาก http://www.uni-graz.at/~huber/ahactivities/content/lecture03/handout/Gent-2006_huber_praznik_loeppert.pdf)

1. สารเคมี

Eluent solution ประกอบด้วย Butanol: Propanol: Ethanol: H_2O ในอัตราส่วน 2: 3: 3: 2 (v/v/v/v)

Sample solution คือสารละลาย 5 % (v/v) Saccharified Cassava Starch

Spray solution คือสารละลาย 30 % H_2SO_4 conc.

Standard solution ได้แก่ สารละลาย 1 % (v/v) Glucose, 1 % (v/v) Fructose, 1 % (v/v) Galactose, 1 % (v/v) Maltose, 1 % (v/v) Sucrose, 1 % (v/v) Lactose และ 1 % (v/v) Malto-triose

2. อุปกรณ์

Thin Layer Chromatography plate (TLC) (Aluminium Silica gel 60 F254) ขนาด 20x20 เซนติเมตร

Simultan Separating Chamber (DESAGA Germany)

Auto Pipet ขนาด 20 ไมโครลิตร

3. วิธีการทดลอง

3.1 ทำการกระตุ้น (Activated) แผ่น TLC โดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่น TLC มาขีดเส้นกำหนดการหยดสาร ด้วยดินสอ โดยทำการลากเส้นให้มีระยะห่างจากของของแผ่น TLC 1.5 เซนติเมตร

3.2 ใช้ Auto Pipet ดูดสารลายน้ำตาลมาตรฐาน และสารละลายน้ำตาลตัวอย่าง มาอย่างละ 2 ไมโครลิตร แล้วทำการจุดสารละลายลงบนแผ่น TLC จนครบทุกตัวอย่าง รอจนสารละลายแห้ง

3.3 นำแผ่น TLC มาวางลงใน Chamber ที่บรรจุสารละลาย Eluent ปริมาตร 120 มิลลิลิตร นำฝามาปิด แล้วรอจนกว่าสารละลาย Eluent จะชะไปจนถึงขอบด้านบนของแผ่น TLC หรือรอจนสารชะไปเป็นระยะทางตามที่กำหนดแล้ว

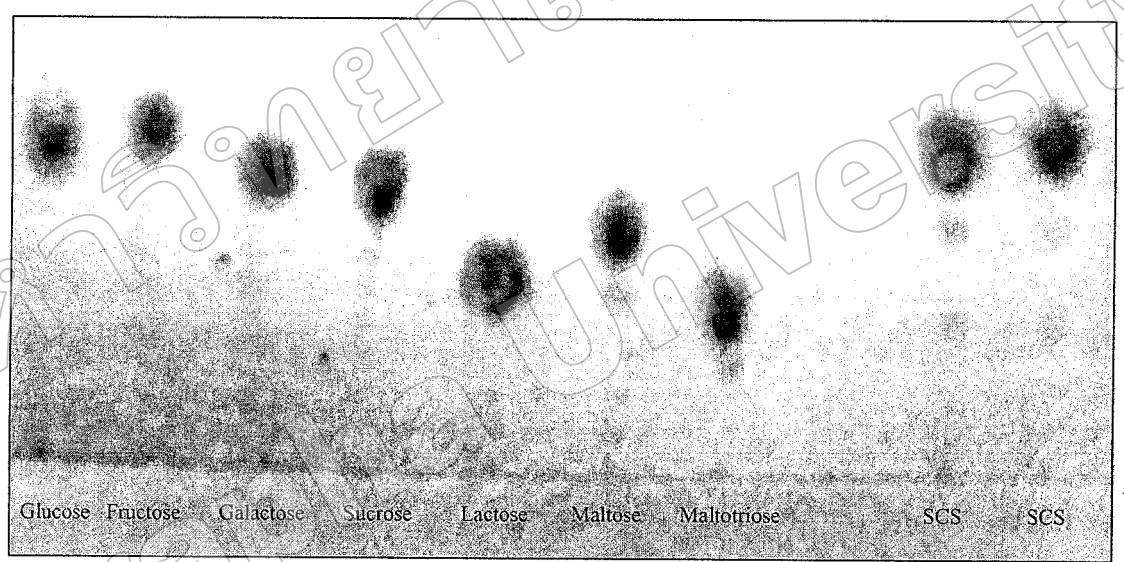
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.4 นำแผ่น TLC ออกจาก Chamber แล้วนำไปผึ่งให้แห้งในตู้ดูดควัน รอจนแผ่น TLC แห้ง จากนั้นจึงทำการฉีดสาร Spray ลงไปบนแผ่น TLC โดยค่อย ๆ ฉีดสารไม่ให้ชุ่มจนเกินไป รอจนแผ่น TLC แห้ง

3.5 นำแผ่น TLC ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วจึงบันทึกผลและถ่ายรูป

4. ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้แสดงในภาพที่ 6-4 พบว่าการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เทอร์มามิล (Termamyl) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะได้ น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส



ภาพที่ 6-4 ผลจากการทดลองแยกชนิดของน้ำตาลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก จ
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Version 11.0)

จะทำการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์เอทานอลโดยปริมาตร (%v/v) ในสภาวะการหมักแบบแบตช์และแบบเฟดแบตช์ ของการทดลองต่าง ๆ ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการทดลอง

การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

ANOVA

ethanol (v/v)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.849	4	.962	3.045	.070
Within Groups	3.160	10	.316		
Total	7.009	14			

ANOVA

P

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	237.246	4	59.311	3.054	.069
Within Groups	194.190	10	19.419		
Total	431.436	14			

ANOVA

residual sugar (mg/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	472.635	4	118.159	2.422	.117
Within Groups	487.820	10	48.782		
Total	960.455	14			

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.507E-03	4	6.266E-04	1.095	.411
Within Groups	5.725E-03	10	5.725E-04		
Total	8.232E-03	14			

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.740E-04	4	9.351E-05	5.947	.010
Within Groups	1.572E-04	10	1.572E-05		
Total	5.313E-04	14			

Yx/s

Duncan[a]

Yeast	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
4= TC2	3	.049367	
1= SB	3	.052300	
3= S3	3	.054100	
5= TC6	3	.055500	
2= S1	3		.064200
Sig.		.108	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

%theoritical yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	96.018	4	24.004	1.096	.410
Within Groups	219.038	10	21.904		
Total	315.055	14			

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาปัจจัยของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ที่คัดเลือกได้

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ETOH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	467.950[a]	20	23.398	40.521	.000
Intercept	7710.514	1	7710.514	13353.49	.000
N	319.254	4	79.813	138.225	.000
CONC	1.500	3	.500	.866	.465
N * CONC	23.390	12	1.949	3.376	.001
Error	27.716	48	.577		
Total	8288.966	69			
Corrected Total	495.666	68			

a. R Squared = .944 (Adjusted R Squared = .921)

ETOH (%v/v)

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
2= ammonium sulfate	12	6.98942		
1= none	9	7.16900		
3= urea	12		10.27575	
5= soy flour	12			12.58483
6= soy liquor	12			12.77467
4= yeast extract	12			13.10742
Sig.		.576	1.000	.128

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .577.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ETOH (%v/v)

Duncan[a,b,c]

Conc.	N	Subset 1	Subset 2
1= none	9	7.16900	
3= 2 g/l	15		10.94773
2= 1 g/l	15		11.07647
5= 8 g/l	15		11.18193
4= 4 g/l	15		11.37953
Sig.		1.000	.190

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .577.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: P

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	28910.731[a]	20	1445.537	41.843	.000
Intercept	475746.985	1	475746.985	13771.12	.000
N	19746.898	4	4936.724	142.900	.000
CONC	83.508	3	27.836	.806	.497
N * CONC	1424.613	12	118.718	3.436	.001
Error	1658.242	48	34.547		
Total	511428.799	69			
Corrected Total	30568.973	68			

a. R Squared = .946 (Adjusted R Squared = .923)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

P

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
2= ammonium sulfate	12	54.8733		
1= none	9	56.2833		
3= urea	12		80.6742	
5= soy flour	12			99.0517
6= soy liquor	12			100.2933
4= yeast extract	12			102.9075
Sig.		.570	1.000	.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 34.547.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

P

Duncan[a,b,c]

concentration	N	Subset 1	Subset 2
1= none	9	56.2833	
3= 2 g/l	15		86.1507
2= 1 g/l	15		86.9600
5= 8 g/l	15		87.7893
4= 4 g/l	15		89.3400
Sig.		1.000	.211

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 34.547.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: S

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21418.553[a]	20	1070.928	41.035	.000
Intercept	51011.179	1	51011.179	1954.608	.000
N	11140.446	4	2785.111	106.718	.000
CONC	224.413	3	74.804	2.866	.046
N * CONC	2083.182	12	173.598	6.652	.000
Error	1252.699	48	26.098		
Total	72274.150	69			
Corrected Total	22671.253	68			

a. R Squared = .945 (Adjusted R Squared = .922)

S

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	2	3	4
4	12	5.069625			
3	12	7.516892			
5	12		29.38587		
2	12		33.69063	33.69063	
6	12			37.58394	
1	9				54.56262
Sig.		.259	.050	.075	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 26.098.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

S

Duncan[a,b,c]

Concentration	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
5	15	19.44557		
2	15	22.82773	22.82773	
4	15		23.95252	
3	15		24.37174	
1	9			54.56262
Sig.		.095	.469	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 26.098.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: YP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.319[a]	20	.016	6.637	.000
Intercept	12.359	1	12.359	5147.163	.000
N	.292	4	.073	30.441	.000
CONC	.004	3	.001	.543	.655
N * CONC	.022	12	.002	.779	.668
Error	.115	48	.002		
Total	12.810	69			
Corrected Total	.434	68			

a. R Squared = .734 (Adjusted R Squared = .624)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

YP

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	2	3	4
2	12	.303025			
3	12		.389342		
1	9		.422889	.422889	
5	12			.455375	.455375
6	12				.479542
4	12				.490783
Sig.		1.000	.109	.121	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .002.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

YP

Duncan[a,b,c]

Concentration	N	Subset 1
2	15	.415427
4	15	.419260
1	9	.422889
3	15	.422953
5	15	.436813
Sig.		.326

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .002.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: YX

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.025[a]	20	.001	20.888	.000
Intercept	.164	1	.164	2722.257	.000
N	.024	4	.006	98.279	.000
CONC	.001	3	.000	3.418	.025
N * CONC	.001	12	5.884E-05	.975	.485
Error	.003	48	6.033E-05		
Total	.193	69			
Corrected Total	.028	68			

a. R Squared = .897 (Adjusted R Squared = .854)

Yx/s

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	2	3	4
2	12	.027608			
3	12	.033675			
4	12		.043783		
1	9		.044922		
6	12			.059367	
5	12				.082917
Sig.		.069	.728	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 6.033E-05.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Yx/s

Duncan[a,b,c]

Concentration	N	Subset 1	Subset 2
2	15	.044727	
1	9	.044922	
3	15	.048580	.048580
4	15	.051267	.051267
5	15		.053307
Sig.		.052	.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 6.033E-05.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10557.697[a]	20	527.885	11.537	.000
Intercept	463788.708	1	463788.708	10135.90	.000
N	10141.828	4	2535.457	55.411	.000
CONC	18.728	3	6.243	.136	.938
N * CONC	391.668	12	32.639	.713	.731
Error	2196.337	48	45.757		
Total	477056.139	69			
Corrected Total	12754.034	68			

a. R Squared = .828 (Adjusted R Squared = .756)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

TE

Duncan[a,b,c]

N-source	N	Subset 1	2	3	4	5
2	12	59.3017				
3	12		76.1908			
1	9			82.7578		
6	12				88.9558	
5	12				89.1167	
4	12					96.0425
Sig.		1.000	1.000	1.000	.955	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 45.757.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.368.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

TE

Duncan[a,b,c]

Concentration	N	Subset 1
2	15	81.2987
5	15	81.5687
4	15	82.0487
1	9	82.7578
3	15	82.7700
Sig.		.625

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 45.757.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.235.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การผลิตเอทานอลแบบแบตช์โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ethanol (%v/v)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23.293[a]	4	5.823	29.873	.000
Intercept	1056.821	1	1056.821	5421.589	.000
F	23.293	4	5.823	29.873	.000
Error	1.949	10	.195		
Total	1082.063	15			
Corrected Total	25.242	14			

a. R Squared = .923 (Adjusted R Squared = .892)

Ethanol (%v/v)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3	4
2	3	6.35433			
3	3		7.99500		
1	3		8.40400	8.40400	
5	3			9.10833	
4	3				10.10700
Sig.		1.000	.283	.079	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .195.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: P (g/l)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1436.572[a]	4	359.143	30.000	.000
Intercept	65142.150	1	65142.150	5441.390	.000
F	1436.572	4	359.143	30.000	.000
Error	119.716	10	11.972		
Total	66698.438	15			
Corrected Total	1556.288	14			

a. R Squared = .923 (Adjusted R Squared = .892)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

P (g/l)

Duncan[a,b]

fermentation	N	Subset 1	2	3	4
2	3	49.8867			
3	3		62.7667		
1	3		65.9800	65.9800	
5	3			71.5067	
4	3				79.3600
Sig.		1.000	.282	.079	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 11.972.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: S (g/l)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	781.368[a]	4	195.342	8.667	.003
Intercept	65021.885	1	65021.885	2884.812	.000
F	781.368	4	195.342	8.667	.003
Error	225.394	10	22.539		
Total	66028.647	15			
Corrected Total	1006.762	14			

a. R Squared = .776 (Adjusted R Squared = .687)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

S (g/l)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
4	3	55.51437		
1	3	60.11367	60.11367	
3	3		66.48437	66.48437
5	3			72.54153
2	3			74.54177
Sig.		.263	.131	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 22.539.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yp/s

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.040[a]	4	.010	27.842	.000
Intercept	3.594	1	3.594	10131.84	.000
F	.040	4	.010	27.842	.000
Error	.004	10	.000		
Total	3.638	15			
Corrected Total	.043	14			

a. R Squared = .918 (Adjusted R Squared = .885)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Yp/s

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3	4
5	3	.430667			
2	3	.454667	.454667		
1	3		.473333		
4	3			.511367	
3	3				.577567
Sig.		.150	.253	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yx/s

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.004[a]	4	.001	213.004	.000
Intercept	.035	1	.035	7825.924	.000
F	.004	4	.001	213.004	.000
Error	4.490E-05	10	4.490E-06		
Total	.039	15			
Corrected Total	.004	14			

a. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .984)

Yx/s

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3
5	3	.028900		
1	3		.038033	
4	3		.040300	
2	3			.066633
3	3			.068133
Sig.		1.000	.219	.406

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 4.490E-06.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Theory yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1512.443[a]	4	378.111	27.851	.000
Intercept	137655.020	1	137655.020	10139.55	.000
F	1512.443	4	378.111	27.851	.000
Error	135.760	10	13.576		
Total	139303.224	15			
Corrected Total	1648.204	14			

a. R Squared = .918 (Adjusted R Squared = .885)

Theory yield

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3	4
5	3	84.2800			
2	3	88.9800	88.9800		
1	3		92.6300		
4	3			100.0700	
3	3				113.0233
Sig.		.149	.253	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 13.576.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

1.4 การผลิตเอทานอลแบบเฟดแบตช์โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ethanol (%v/v)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.584[a]	3	.195	6.745	.014
Intercept	887.847	1	887.847	30764.99	.000
F	.584	3	.195	6.745	.014
Error	.231	8	.029		
Total	888.662	12			
Corrected Total	.815	11			

a. R Squared = .717 (Adjusted R Squared = .610)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ethanol (%v/v)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2
4	3	8.35933	
1	3	8.40400	
2	3		8.81133
3	3		8.83167
Sig.		.756	.887

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .029.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: P (g/l)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	35.130[a]	3	11.710	6.641	.015
Intercept	54689.851	1	54689.851	31017.24	.000
F	35.130	3	11.710	6.641	.015
Error	14.106	8	1.763		
Total	54739.087	12			
Corrected Total	49.236	11			

a. R Squared = .714 (Adjusted R Squared = .606)

P (g/l)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2
4	3	65.6300	
1	3	65.9800	
2	3		69.0867
3	3		69.3400
Sig.		.755	.821

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 1.763.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: S (g/l)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1241.668[a]	3	413.889	18.281	.001
Intercept	42897.603	1	42897.603	1894.746	.000
F	1241.668	3	413.889	18.281	.001
Error	181.122	8	22.640		
Total	44320.393	12			
Corrected Total	1422.790	11			

a. R Squared = .873 (Adjusted R Squared = .825)

S (g/l)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
2	3	43.49470		
1	3		60.11367	
4	3		64.55603	64.55603
3	3			70.99413
Sig.		1.000	.286	.136

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 22.640.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yp/s

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.003[a]	3	.001	6.712	.014
Intercept	2.796	1	2.796	19117.67	.000
F	.003	3	.001	6.712	.014
Error	.001	8	.000		
Total	2.800	12			
Corrected Total	.004	11			

a. R Squared = .716 (Adjusted R Squared = .609)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Yp/s

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2
2	3	.466767	
1	3	.473333	
3	3	.482700	
4	3		.508000
Sig.		.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .000.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yx/s

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000[a]	3	.000	43.837	.000
Intercept	.025	1	.025	11052.11	.000
F	.000	3	.000	43.837	.000
Error	1.831E-05	8	2.288E-06		
Total	.026	12			
Corrected Total	.000	11			

a. R Squared = .943 (Adjusted R Squared = .921)

Yx/s

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
1	3	.038033		
3	3		.045267	
2	3			.049267
4	3			.051067
Sig.		1.000	1.000	.183

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 2.288E-06.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Theory yield

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	112.633[a]	3	37.544	6.682	.014
Intercept	107074.188	1	107074.188	19057.29	.000
F	112.633	3	37.544	6.682	.014
Error	44.948	8	5.619		
Total	107231.770	12			
Corrected Total	157.581	11			

a. R Squared = .715 (Adjusted R Squared = .608)

Theory yield

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	Subset 2
2	3	91.3467	
1	3	92.6300	
3	3	94.4567	
4	3		99.4100
Sig.		.162	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.619.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลแบบแบตซ์และแบบเฟดแบตซ์โดยขยายขนาดเป็น 3 ลิตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ethanol (%v/v)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	24.142[a]	7	3.449	25.853	.000
Intercept	1732.521	1	1732.521	12987.29	.000
F	24.142	7	3.449	25.853	.000
Error	2.134	16	.133		
Total	1758.798	24			
Corrected Total	26.276	23			

a. R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .883)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ethanol (%v/v)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3	4	5
2= BF50	3	6.3543				
3= BF100	3		7.9950			
8= 1/3Umax	3		8.3593	8.3593		
1= control	3		8.4040	8.4040		
6= Umax	3			8.8113	8.8113	
7= 2/3Umax	3			8.8317	8.8317	
5= BF400	3				9.1083	
4= BF200	3					10.1070
Sig.		1.000	.212	.164	.360	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = .133.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: P (g/l)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1485.797[a]	7	212.257	70.377	.000
Intercept	106725.341	1	106725.341	35386.29	.000
F	1485.797	7	212.257	70.377	.000
Error	48.256	16	3.016		
Total	108259.394	24			
Corrected Total	1534.053	23			

a. R Squared = .969 (Adjusted R Squared = .955)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

P (g/l)

Duncan[a,b]

Fermentation	N	Subset 1	2	3	4	5
2= BF50	3	49.8867				
3= BF100	3		62.7667			
8= 1/3Umax	3		65.6300	65.6300		
1= control	3			65.9800		
6= Umax	3				69.0867	
7= 2/3Umax	3				69.2733	
5= BF400	3				71.5067	
4= BF200	3					79.3500
Sig.		1.000	.061	.808	.124	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 3.016.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University