สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Biological Production of Butanol from Glycerol

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

RCH
TP
248
.B8
ว2331ก
ฉ.1
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120209
วัน,เดือน,ปี 9 ก.พ. 2555

b.12340327
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงงาน	การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ
Research title	Biological Production of Butanol from Glycerol
แหล่งเงิน	เงินวิจัยงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ	2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หน่วยงาน	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทร. 087-698-5528 email: vorapats@hotmail.com
คำสำคัญ	บิวทานอล, กลีเซอรอล, *Clostridium beijericnkii*, *Clostridium acetobutyricum*, การหมักในสภาวะไร้อากาศ

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และ *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 ทดแทนกลูโคสเพื่อการผลิตบิวทานอล ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ นอกจากเอาไปใช้เป็นตัวทำละลายแล้ว ยังสามารถใช้แทนดีเซลและคีโรซีน แล้วเอาไปทำเป็นสารรักษาอาหารสัตว์ สารฆ่าเชื้อ และสาร C4 ในอุตสาหกรรมเคมี

สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่นำมาทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะไร้อากาศในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร) เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตจะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 พบเป็นจำนวน 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่จะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research title	Biological Production of Butanol from Glycerol
Scholarships	Thai Budget for Research
Fiscal Year	2009 **Research budget** 200,000 Baht
Research period	One year from 1st October 2009 to 30th September 2010
Researcher	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph. D.
Office	Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Tel. 087-698-5528 Email: vorapats@hotmail.com
Keywords	butanol, glycerol, *Clostridium beijericnkii*, *Clostridium acetobutyricum*, anaerobic cultivation

ABSTRACT

According to the crisis of the petroleum's current price, the importance of the renewable energy has been increasing, especially the production of biodiesel in form of methylester produced by using chemical transesterification processes. One of these processes' by-products was 10% glycerol, which has been increased with the growing trend of biodiesel production. However, by-product, such as glycerol, could be transformed to higher valued products and reduced the cost of by-product elimination. There have been several reports to use glycerol as a substrate for the production of butanol by biotechnology process. Hence, this study was interested to cultivate *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 and *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 in glycerol for the production of butanol, which could be renewable energy, industrial solvent and feed additives.

When using *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462, the fermentation studies were conducted in shake-flasks with anaerobic conditions in the medium at 200 rpm and 30 °C. Sampling was carried out every 24 hours. The maximum growth of microorganisms (1.33×10^8 CFU/mL) was found at 120 hours of cultivation. Furthermore, in order to study appropriate glycerol amount for growth, the varied concentrations of glycerol (10, 20, 30, 40 and 50 g/L)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

were added in the medium. The study was found that microbial cells were maximized when the concentration of glycerol was 40 g/L. After cultivation of 144 hours, the maximum cell number was 4.80 x 10^9 CFU/mL. Then, the sampling's supernatants were analyzed for the amount of substances occurred during fermentation by HPLC. The result suggested that no main substance, which should be generated during the fermentation process, acetone, buthanol and ethanol, was discovered. However, methanol, one of the intermediates in the hydrogen metabolism was obtained in the sampling gained from the addition of glycerol as substrate in the medium.

After medium alteration to GYCC, however, *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 was cultivated in media containing glucose and glycerol as carbon sources in 250-mL flasks, 2-L fermenter with and without agitation. The maximum amount of cells (2.24 10^9 CFU/mL) was given in GYCC medium containing glycerol in 2-L bioreactor without agitation at 120 hours. The pH of the medium decreased from 6.76 to 5.98 after 72 hours of cultivation and increased to 6.04-6.06 until the end of the cultivation (144 hours). Moreover, the butanol concentration of 0.063 g/L was found since 24 hours of the cultivation in the same condition. Furthermore, while *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 was cultivated in GYCC medium containing glycerol in 2-L bioreactor with 200-rpm agitation, the butanol concentration of 0.117 g/L and the maximum amount of cells of 2.30×10^8 CFU/mL were obtained at 120 and 96 hours, respectively. In addition, little amount of 1,3-propanediol was discovered in all 2-L bioreactor cultivations.

Clostridium beijericnkii TISR 1390 was cultivated for the production of buthanol. Glycerol was by-product from transesterification (biodiesel process). The fermentation investigations were conducted in 250-ml flasks with anaerobic condition at 37 °C. Sampling was carried out every 24 hours for chemicals analysis and viable cell plate count. The addition of 60 g/l glucose to the medium was resulted the maximum growth of 8.33 x10^6 CFU/ml at 24 hours of the cultivation, while the maximum growth of microorganism (3.93 x10^6 CFU/ml) was presented at 24 hours with the addition of 20 g/l glucose. The addition of 20 g/l glycerol provided 4.78 x10^6 CFU/ml at 168 hours. Subsequently, the supernatants of the samples were analyzed for the amount of substances occurred during fermentation by HPLC. The maximum concentration of butanol (8.11 g/l) was found in 120 hour and acetone concentration of 1.65 g/l was found in 168 hour sample with the addition of 60 g/l glucose. The addition of 20 g/l glucose gave the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

maximum buthanol level of 4.70 g/l and acetone concentration of 0.793 g/l at 144 hours. The addition of 20 g/l glycerol gave the maximum butanol level of 3.796 g/l and acetone couldn't be discovered in the samples from the fermentation. However, ethanol couldn't be obtained in the samples from the fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อภาษาไทย		II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		V
สารบัญ		VIII
สารบัญตาราง		XII
สารบัญรูป		XIX
บทที่ 1	**บทนำ**	1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
2.1	บิวทานอล (Butanol)	5
	2.1.1 ประวัติของบิวทานอล	5
	2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล	6
	2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล	6
	2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล	10
2.2	กลูโคส (Glucose)	11
	2.2.1 แหล่งที่มา	11
	2.2.2 คุณสมบัติของกลูโคส	12
	2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล	14
2.3	กลีเซอรอล (Glycerol)	14
	2.3.1 ประวัติของกลีเซอรอล	14
	2.3.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล	15
	2.3.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	15
	2.3.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล	18
	2.3.5 การหมักกลีเซอรอล	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.4.6 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล	25
2.4	กระบวนการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล	30
	2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก	30
	2.4.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก	32
	2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก	33
2.5	สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	36
	2.5.1 *Clostridium acetobutylicum*	37
	2.5.2 *Clostridium beijerinckii*	38
2.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล	39
บทที่ 3	**อุปกรณ์และวิธีการทดลอง**	47
	3.1 เชื้อจุลินทรีย์	
	3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*	47
	3.1.2 *Clostridium beijerinckii*	47
	3.2 สารเคมี	47
	3.3 อุปกรณ์	47
	3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ	48
	3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial	48
	3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*สูตรที่ 1	49
	3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*สูตรที่ 2	49
	3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	50
	3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ	51
	3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	51
	3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	51
	3.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ	52
	3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 1	52
	3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในระดับฟลาสก์	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ไม่ใช้ใบพัด	52
3.6.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ใบพัด	53
3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	53
3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	53
3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์	53
3.7.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	54
3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ	54
3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	55
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1	56
4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	56
4.1.2 การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์	61
4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2	64
4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์	64
4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัด	68
4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ใบพัด	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390	80
4.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม	80
4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส	84
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	93
เอกสารอ้างอิง	97
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน	106
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ	116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล	7
2.2	ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล	7
2.3	คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล	9
2.4	คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส	13
2.5	การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล	16
2.6	คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	17
2.7	คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล	18
2.8	มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้	19
2.9	รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล	24
4.1	ผลของการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	58
4.2	ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	59
4.3	ปริมาณเมทานอลที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ	61
4.4	ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*เมื่อเวลาผ่านไป	62
4.5	ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง	62
4.6	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	67
4.8	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	69
4.9	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	72
4.10	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	74
4.11	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	75
4.12	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	76
4.13	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.14	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	79
4.15	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	81
4.16	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	83
4.17	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	85
4.18	ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	87
4.19	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	89
4.20	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	90
ก.1	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์	106
ก.2	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร	107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล	116
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคส	119
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร	121
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร	123
ข.5	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร	125
ข.6	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร	127
ข.7	การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	129
ข.8	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	131
ข.9	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	133
ข.10	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	135
ข.11	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.12	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	139
ข.13	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	141
ข.14	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	143
ข.15	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	145
ข.16	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	147
ข.17	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	149
ข.18	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	151
ข.19	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	153
ข.20	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	155
ข.21	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	157
ข.22	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	159
ข.23	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	161

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.24	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	163
ข.25	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	165
ข.26	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	167
ข.27	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	169
ข.28	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	171
ข.29	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	173
ข.30	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	175
ข.31	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหารP2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	177
ข.32	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหารP2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	179
ข.33	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	182
ข.34	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	184
ข.35	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	186
ข.36	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.37	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	191

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium berjerinckii*	2
2.1	โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	5
2.2	Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน	9
2.3	การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก	11
2.4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส	13
2.5	สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด	15
2.6	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	18
2.7	เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล	25
2.8	ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO	27
2.9	วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate	28
2.10	ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล	29
2.11	ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า	31
2.12	ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
2.13	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส(phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต- บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-COA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส(butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)	34
2.14	ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*	37
2.15	ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน	38
2.16	วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์ และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับจำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC	41
4.1	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณแหล่งอาหารที่เหลืออยู่ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ก) ในอาหารชุดควบคุมที่มีกลูโคสและ (ข) ในอาหารที่มีกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ	57
4.2	ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* สูงสุด ที่ 120 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และที่ 144 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.3	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▩ ปริมาณกลูโคส)	65
4.4	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	66
4.5	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▩ ปริมาณกลูโคส)	69
4.6	วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม	71
4.7	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	72
4.8	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	73
4.9	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	77
4.11	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	79
4.12	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (—◆—) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (—■—) ในอาหารอุดม P2	82
4.13	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—×—) อะซีโตน (—+—) 1,3-โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	84
4.14	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C .beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	86
4.15	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (--◆--) และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	88
4.16	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (×) อะซีโตน (—+—) 1,3-โพรเพนนอล (●) และค่าความเป็นกรดด่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.17	ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (-·-×-·-) 1,3โพรเพนไดออล (-·-+-·-) และค่าความเป็นกรดด่าง (-·-▲-·-) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	92
ก.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์	107
ก.2	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium acetobutylicum* ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร	108
ก.3	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium beijerinckii*	108
ก.4	กราฟมาตรฐานของ 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC	109
ก.5	กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	109
ก.6	กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	110
ก.7	กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	110
ก.8	กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาโอนิคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	111
ก.9	กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	111
ก.10	กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	112
ก.11	กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	112
ก.12	กราฟมาตรฐานของซอร์บิทอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	113
ก.13	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ (ก) บิวทานอลมาตรฐาน (ข) ตัวอย่างที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง	114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

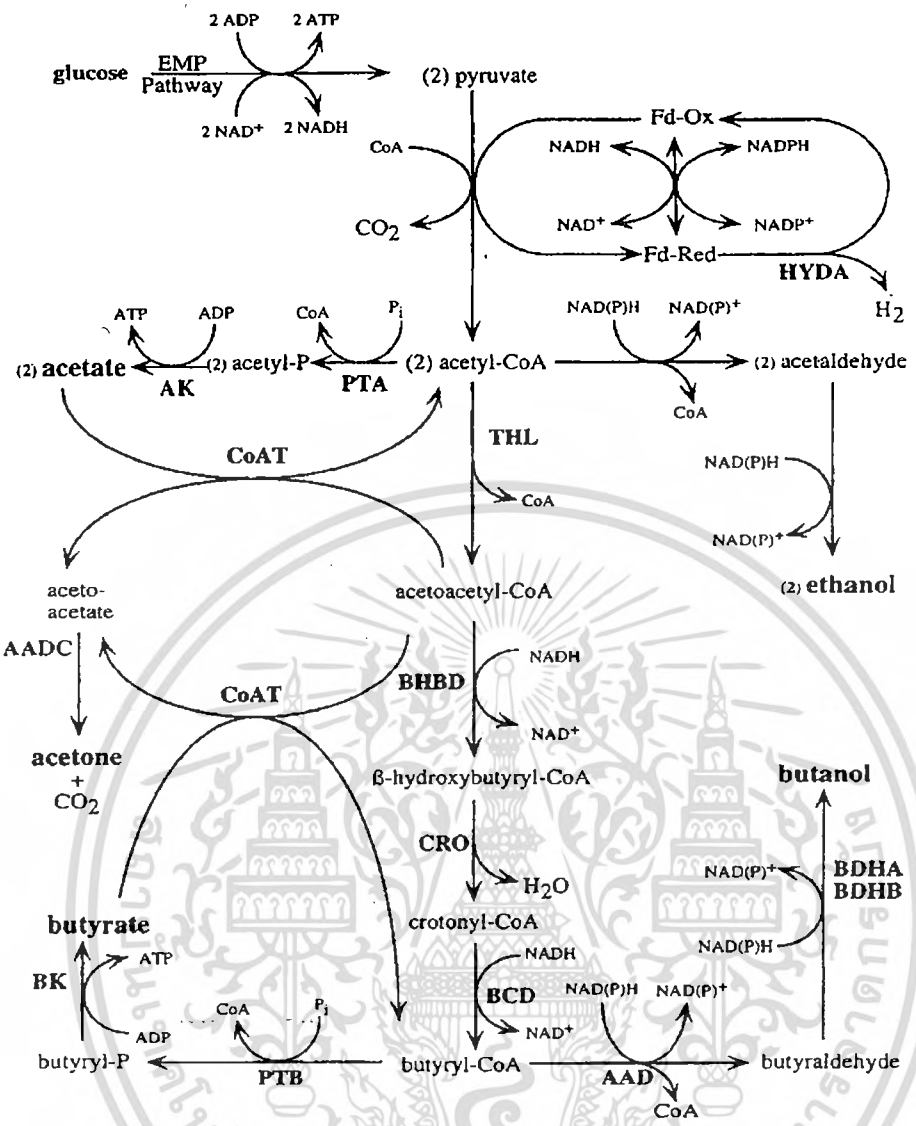
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

เนื่องจากภาวการณ์ปัจจุบันกำลังประสบปัญหาในเรื่องพลังงานเชื้อเพลิงที่มีการลดจำนวนลง ตลอดจนปัญหาของราคาน้ำมันที่มีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ซึ่งได้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภคเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงทำให้เกิดการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ และพลังงานทางเลือกที่จะใช้ทดแทนพลังงานประเภทใช้แล้วหมดไป เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ (พัฒนาและคณะ, 2549) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพลังงานทางเลือกเพิ่มมากขึ้น อาทิ เช่น เอทานอล และบิวทานอล โดยกระบวนการหมัก เพื่อเป็นการตอบสนองการปรับตัวสูงของราคาก๊าซโซลีน และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ (Qureshi และคณะ, 2007)

บิวทานอล หรือ บิวทิวแอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นคาร์บอน 4 อะตอม และมีสูตรโมเลกุลเป็น C_4H_9OH เป็นสารที่มีขั้วอ่อนๆจึงมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวต่ำ สามารถติดไฟได้ง่าย ทำให้เกิดการนำเอาบิวทานอลมาใช้เป็นผลิตเชื้อเพลิง บิวทา-นอลเป็นผลิตภัณฑ์กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งเป็นตัวปั่นสารเคมีที่ดีในอุตสาหกรรมพลาสติก เป็นตัวแยกระดับของอาหารในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมปรุงแต่งรส และที่สำคัญเป็นเชื้อเพลิงที่มีข้อดีเมื่อเทียบกับ เอทานอล (Formanek และคณะ,1997; Parekh และคณะ,1998; Parekh และคณะ ,1999) บิวทานอลมีปริมาณออกซิเจนร้อยละ 22 จึงทำให้เชื้อเพลิงมีการเผาไหม้ดีกว่าเอทานอล และเป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่าเอทานอล 2 เท่า ทำให้มีค่าพลังงานมากกว่า เอทานอล (ค่าพลังงานของบิวทา-นอลและเอทานอลเท่ากับ 110 และ 78 เคบียูต่อแกลลอนตามลำดับ) (http://www.butanol.com, 2010) การค้นพบบิวทานอลเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1861 โดย Pasteur ได้ทำการผลิตบิวทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ เป็นครั้งแรก ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Sehardinger ได้ค้นพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดร่วมกับบิวทานอลในการหมัก คือ อะซีโตน ต่อมากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลได้ถูกพัฒนาขึ้น เนื่องจากเกิดปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบิวทาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตยางสังเคราะห์ (Jones และ Woods, 1986) แต่ในขณะปัจจุบัน ได้เกิดความสนใจในการค้นคว้าเชื้อเพลิงชีวภาพบิวทานอลเพิ่มมากขึ้น ที่สามารถผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย และโดยทั่วไปจะใช้สายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinckii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium berjerinckii*
ที่มา: Ruchir และคณะ (1999)

กระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตบิวทานอลนั้นเกิดจากการนำเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการผลิต โดยในการทำงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium berjerinckii* ในการผลิตบิวทานอล ซึ่งเชื้อสองสายพันธุ์นี้จะสามารถหมักแป้งและน้ำตาลได้บิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นแรกช่วงนี้ว่า Acidogenesis phase ซึ่งจะทำการผลิตกรดจำพวกกรดอะซีติกและกรดบิวทาริค และช่วงที่สองจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการเปลี่ยนสารละลายในกระบวนการผลิตให้เป็นผลิตภัณฑ์ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (อัตราส่วนของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะเป็น 3:6:1) (Ruchir และคณะ, 1999) วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จะเกิดขึ้นดังรูปที่ 1.1 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักของ *Clostridium* ทั้งสองสายพันธุ์นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และได้เอทานอลและอะซีโตนเป็นผลพลอยได้ในกระบวนการหมัก

ในงานวิจัยนี้ต้องการทราบว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium berjerinckii* นั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้โดยการเติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำมาเปรียบเทียบกับการเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการมุ่งเน้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และ *Clostridium berjerinckii* TISTR 1390 โดยใช้กลีเซอรอลเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเจริญเติบโตจากกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และ *Clostridium berjerinckii* TISTR 1390
2. ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์
3. ศึกษาการนำกลีเซอรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้น สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ โดยใช้กระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ
4. เป็นการพัฒนานักวิจัยและเทคโนโลยีเพื่อให้รองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมด้านพลังงานไบโอดีเซลของประเทศในอนาคต

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปให้เป็นบิวทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และ *Clostridium berjerinckii* TISTR 1390 ที่ซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศ จากนั้น ทำการมาทดลองหาเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลของเชื้อจากกลีเซอรอลในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยเปรียบเทียบกับกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลได้ปริมาณมากจากการใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบ
2. เป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเรื่องนี้ในขั้นตอนต่อไป คือ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการขยายขนาดสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป
3. เป็นการพัฒนานักวิจัยและเทคโนโลยีเพื่อให้รองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมด้านพลังงานไบโอดีเซลของประเทศในอนาคต
4. เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างรายได้ และลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ

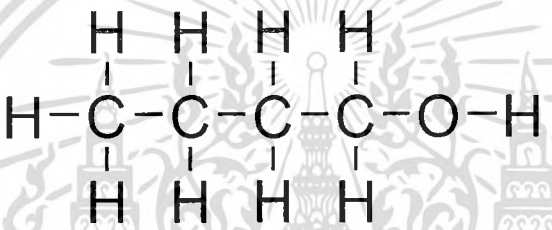
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล (Butanol)

บิวทานอล หรือบิวทิล แอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยคาร์บอน 4 ตัว และหมู่ไฮดรอกซิล (OH-) ที่มีโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH ตามแบบในรูปที่ 2.1 ซึ่งเป็นสารมีขั้วอ่อนๆ ซึ่งมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด และจุดหลอมเหลวต่ำ ในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลว และระเหยได้ง่าย บิวทานอลสามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล
ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Butanol_flat_structure.png (01/04/2554)

2.1.1 ประวัติของบิวทานอล

บิวทานอลถูกค้นพบครั้งแรกครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดย Pasteur โดยใช้จุลินทรีย์เป็นครั้งแรก ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Schardinger ได้ค้นพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดร่วมกับบิวทานอลในการหมักคืออะ-ซีโตน ต่อมากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องจากเกิดปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของบิวทาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตยางสังเคราะห์ (Jones และ Woods, 1986)

ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 อุตสาหกรรมมีความต้องการอะซีโตนมากขึ้น เนื่องจากมีความสำคัญในการเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตระเบิด ต่อมาภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยการหมัก ได้รับความสนใจน้อยลงเพราะความสนใจน้อยลงเพราะการเจริญของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี เมื่อปี ค.ศ. 1973 และ ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา (สุนทร, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

ในปัจจุบันบิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ อีกทั้งยังใช้บิวทานอลในการเป็นตัวทำละลายที่ต้องการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล

นอกจากนี้บิวทานอลยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอม และในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้เชื้อเพลิงได้โดยตรง โดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลมีความร้อนมากกว่าเอทานอลและมีความร้อนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน

2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล

2.1.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

บิวทานอลมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

2.1.3.2 คุณสมบัติทางเคมี

บิวทานอลมีชื่อเรียกทั่วไปและทางเคมี ดังแสดงตามตารางที่ 2.2

2.1.3.3 คุณสมบัติทางด้านพลังงาน

การเปลี่ยนรูปพลังงานที่ได้จากบิวทานอลจะเหมือนกับแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ กล่าวคือ

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน (Gasohol)
3. นำไปผสมกับน้ำมันดีเซล (Desohol)
4. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูง
5. ค่าออกเทน จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน
6. ใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าจาก fuel cell แต่อยู่ในขั้นการวิจัย แต่มีแนวโน้มได้ได้ผลดีกว่าการใช้ แอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวใส
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	คล้ายเอทานอล
น้ำหนักโมเลกุล	74.12
จุดเดือด	117 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-89.5 องศาเซลเซียส
ความดันไอ	7.3 มิลลิปรอท ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0. 810 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น(กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.809 - 0.812 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่นของไอ	2.6
ความสามารถในการละลายน้ำ	7.7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส
อัตราการระเหย	0.5
ความเป็นกรดด่าง (pH)	ไม่มีข้อมูล

ที่มา: http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

ตารางที่ 2.2 ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล

ชื่อ IUPAC	1-บิวทานอล (1-Butanol)
ชื่อทั่วไป	เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) เอ็นบีเอ (NBA) , บิวทิว แอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol)
ชื่อพ้องอื่นๆ	บิวทาน-1-ออล (Butan-1-ol)
สูตรโมเลกุล	C_4H_9OH

ที่มา: http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

ก) คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

ข) ค่าออกเทน (octane rating)

ค่าออกเทน (octane rating) ของบิวทานอลมีค่าประมาณ 100 เมื่อผสมน้ำมันกับบิวทานอล ค่าออกเทนของน้ำมันเบนซินเพิ่มขึ้นในอัตราที่น่าสนใจ กล่าวคือ ค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่าต่อการเติมบิวทานอลทุกร้อยละ 10 โดยปริมาตรของบิวทานอลที่ผสม ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 2.2 ทั้งนี้อัตราเพิ่มของค่าออกเทนจะลดลงเล็กน้อย เมื่อส่วนผสมเพิ่มมากกว่าร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน (octane improver) แทนที่สารตะกั่วหรือสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) เป็นสารเคมีที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ผลิตขึ้นได้จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง Methanol และ Isobutaneได้ ซึ่งในอัตราส่วนร้อยละ 20 โดยปริมาตร จะทำให้น้ำมันเบนซินธรรมดาในท้องตลาดประเทศไทยมีค่าออกเทนประมาณ 91 ซึ่งเพียงพอกับเครื่องยนต์ส่วนใหญ่ที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย

ค) ค่าซีเทน (cetane rating)

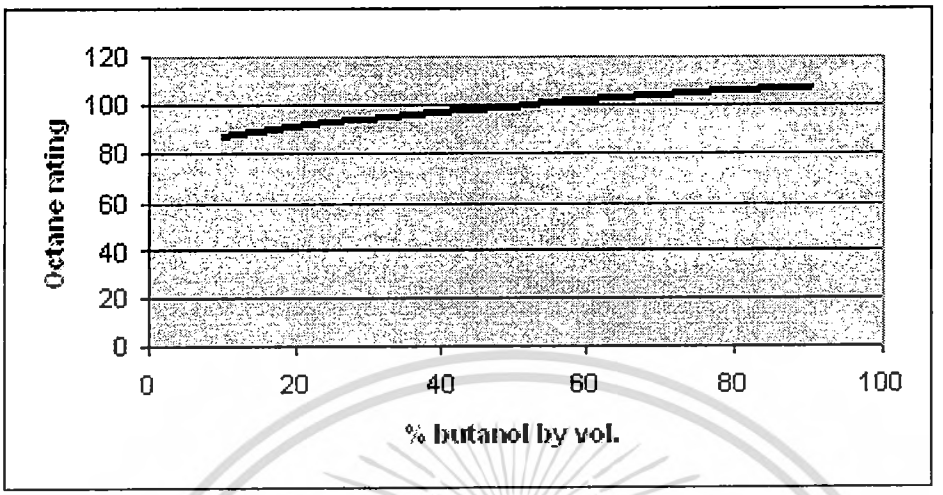
ส่วนค่าซีเทน (cetane rating) ซึ่งใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันดีเซล พบว่าบิวทานอลมีค่าซีเทนประมาณ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซล ซึ่งมีค่าประมาณ 48.8 จะเห็นว่าค่าซีเทนของบิวทานอลต่ำกว่ามาก จนมีความจำเป็นต้องเติมสารเพิ่มค่าซีเทน (cetane improver) เช่น ไอโซบิวทิวไนเตรต (isobutyl nitrate) พบว่า หากผสมน้ำมันดีเซลร้อยละ 75 เปอร์เซ็นต์ บิวทานอลร้อยละ 23.75 และไอโซบิวทิวไนเตรตร้อยละ 1.25 จะได้ค่าซีเทน 45.4 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (high speed diesel fuel) ซึ่งมีค่าซีเทน 48.8 ส่วนคุณสมบัติอื่นๆสามารถดูได้ในตารางเปรียบเทียบข้างล่าง

การใช้พลังงานจากบิวทานอลในอนาคต

บิวทานอลจัดว่าเป็นแอลกอฮอล์ที่มีอนาคตไกลมากที่สุดเนื่องด้วยเหตุผลหลายประการ คือ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่บริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนและไม่ต้องเก็บในระบบที่มีความดันสูงเหมือนแก๊สธรรมชาติเนื่องจากการระเหยต่ำ ซึ่งต่ำกว่าการระเหยของน้ำมัน สามารถรวมตัวกับน้ำมันได้ดีไม่เกิดการแยกตัว สามารถขนส่งตามท่อเนื่องจากไม่มีการกัดกร่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมือนแอลกอฮอล์ตัวอื่น ดังจะเห็นได้จากค่าคุณสมบัติทางพลังงานที่ใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีน มากกว่าแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.2 ค่า Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน
ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (25/04/2554)

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล

คุณสมบัติทางพลังงาน ของน้ำมันรถ บิวทานอล เอทานอล เมทานอล	Energy density (MJ/L)	Air-fuel ratio	Specific energy (MJ/kg air)	Heat of vaporization (MJ/kg)	RON	MON
น้ำมันแก๊สโซลีน	32	14.6	2.9	0.36	91–99	81–89
บิวทานอล	29.2	11.2	3.2	0.43	96-110	78-90
เอทานอล	19.6	9.0	3.0	0.92	129	102
เมทานอล	16	6.5	3.1	1.2	136	104

ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (25/04/2554)

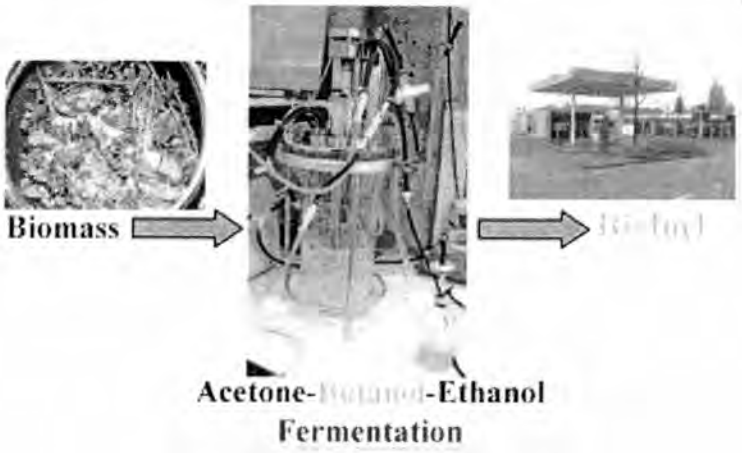
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล

บิวทานอลสามารถได้มาจากหลายวิธีคือกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน กระบวนการหมักจากมวลชีวภาพบางชนิด และ กระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมาคือ กระบวนการหมัก โดยใช้แบคทีเรียที่เหมาะสม ซึ่ งในการหมัก มักจะเรียกว่ากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation) โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Clostridium* เช่น *Clostridium butyricum* และ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งเดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อ ผลิตอะซีโตน จากสารจำพวกแป้ง ซึ่งตอนนั้นบิวทานอลและเอทานอลเป็นผลพลอยได้ที่ได้ออกมาจากการหมัก ซึ่งบิวทานอลที่ได้นั้นมากพอสมควร

ในปัจจุบัน กระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล มีกระบวนการดังนี้คือ เมื่อสารตั้งต้น เช่น น้ำตาล ถูกหมักโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* นั้นจะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นบิวทานอล ซึ่งในกระบวนการนี้ แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ที่เปลี่ยนสารอาหารให้เป็นบิวทานอลจะตายไป ตามแผนภาพที่แสดงในรูป 2.3 เมื่อความเข้มข้นของบิวทานอลประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความพยายามที่จะค้นคว้าให้แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งใช้ในการหมักสามารถทนทานต่อบิวทานอลให้ได้มากขึ้น เพื่อให้ผลผลิตของบิวทานอลมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการศึกษาพบว่า บิวทานอลให้พลังงานได้สูงกว่าเอทานอลตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้พวกของเหลือจากการผลิตเอทานอลยังสามารถนำมาผลิตบิวทานอลต่อได้อีกด้วย (โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถานบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

ที่มา: www.bpe.wur.nl/UK/Research/Projects/Maximal+butanol+yield+by+directed+engineering (25/03/2554)

2.2 กลูโคส (Glucose)

กลูโคส เป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน และสารเผาผลาญขั้นกลาง (metabolic intermediate) กลูโคสเป็นหนึ่งในผลผลิตหลักของการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหายใจของเซลล์ (cellular respiration) โครงสร้างโมเลกุลตามธรรมชาติของมัน (D-glucose) จะอยู่ในรูปที่เรียกว่า เดกซ์โตรส (dextrose) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร (http://th.wikipedia/กลูโคส, 01/04/2554)

2.2.1 แหล่งที่มา

จากธรรมชาติ

1. ในพืชและสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต จากการสังเคราะห์แสง

2. ในสัตว์และเชื้อรา จากการแยกสลายไกลโคเจน โดยกระบวนการที่รู้จักกันในชื่อ การสลายไกลโคเจน (Glycogenolysis) ในพืชจะเป็นการแยกสลาย ซับสเตรต คือ แป้ง

3. ในสัตว์ กลูโคสจะถูกสังเคราะห์ในตับและไต จากสารขั้นกลาง (intermediates) ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต (non-carbohydrate) เช่น ไพรูเวต (pyruvate) และ กลีเซอรอล (glycerol) โดยกระบวนการที่เรียกว่า กลูโคนีโอเจนีสิส (gluconeogenesis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตทางการค้า

กลูโคสสามารถผลิตเป็นการค้าได้โดยการ ไฮโดรไลซิสแป้ง ที่มี เอ็นไซม์ ช่วยเร่งปฏิกิริยา พืชผักมากมายสามารถใช้เป็นแหล่งของแป้งได้เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันเทศ มันสำปะหลัง (cassava) ต้นไม้เท้ายายม่อม (arrowroot) และ สาคู การใช้แป้งจากพืชจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของโลก ในสหรัฐอเมริกาแป้งส่วนใหญ่จะเป็นแป้งข้าวโพด (จากต้นข้าวโพด) ในประเทศแถบเอเชียอย่างประเทศไทย จะใช้ข้าวทำแป้งเช่น แป้งข้าวจ้าวและแป้งข้าวเหนียว

กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนแรกใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 100 °C เอนไซม์เหล่านี้จะ ไฮโดรไลซ์แป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เล็กลง โดยจะมีโมเลกุลของกลูโคส 5-10 หน่วย ความผิดเพี้ยนของกระบวนการจะอยู่ที่การต้มส่วนผสมของแป้งที่อุณหภูมิ 130 °C หรือร้อนกว่านี้ หนึ่งครั้งหรือมากกว่า การใช้ความร้อนระดับนี้เพื่อช่วยการละลายของแป้งในน้ำแต่มันก็จะทำลายฤทธิ์เอนไซม์ ซึ่งจะต้องเติมเอนไซม์เข้าไปใหม่ในการต้มแต่ละครั้ง

2. ขั้นตอนที่สองเรียกว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะไฮโดรไลซ์แป้งบางส่วนและไฮโดรไลซ์กลูโคสอย่างสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จาก เชื้อรา *Aspergillus niger* สภาวะของปฏิกิริยาจะต้องควบคุมให้อยู่ที่ pH 4.0-4.5 อุณหภูมิ 60 °C และความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะต้องอยู่ที่ 30-35% โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวการณ์เหล่านี้แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสประมาณ 96% หลังจากใช้เวลา 1-4 วัน ถ้าจะให้ผลผลิตสูงกว่านี้สามารถทำได้โดยการทำให้สารละลายจางลง แต่จะต้องใช้หม้อต้มที่ใหญ่กว่าและต้องการน้ำมากกว่าซึ่งสรุปแล้วไม่ประหยัดกว่า สารละลายกลูโคสที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกรอง และเคี่ยวให้งวดในเครื่องระเหยเอนกประสงค์ (multiple-effect evaporator) ดี-กลูโคสที่เป็นของแข็งจะทำได้โดย การตกผลึก (crystallization)

2.2.2 คุณสมบัติของกลูโคส

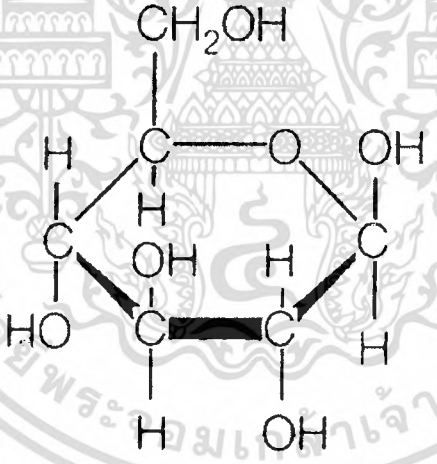
กลูโคสมีชื่อเรียกทางเคมีและคุณสมบัติตามตารางที่ 2.4 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูป 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส

ชื่อ IUPAC	6-(hydroxymethyl)oxane -2,3,4,5-tetrol หรือ (2R,3R,4S,5R,6R) -6 -(hydroxymethyl) tetrahydro -2H-pyran-2,3,4,5-tetraol
ชื่ออื่น	เด็กซ์โตส(Dextrose)
สูตรเคมี	$C_6H_{12}O_6$
น้ำหนักโมเลกุล	180.156 กรัมต่อโมล
ความหนาแน่น	1.54 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
จุดหลอมเหลว	α-D-glucose:146 °C β-D-glucose: 150 °C

ที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A5%E0%B8%B9%E0%B9%82%E0%B8%84%E0%B8%AA (22/03/2554)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส

ที่มา: http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap1/chapter1_2.html (22/03/2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล

Monot และคณะ (1982) ได้รายงานว่าในการหมักอะซีโตน บิวทานอลของ *C. acetobutylicum* ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารตั้งต้น พบว่ากลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นต่ำ (5-10 กรัมต่อลิตร) จะทำให้การหมักเกิดขึ้นเพียงครั้งเดียว คือขั้นตอนการสร้างกรดอินทรีย์เท่านั้น จะไม่มีการสร้างตัวทำละลาย กลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 20-40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อเจริญได้ดีที่สุด และกลูโคสที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร จะทำให้ *Clostridium* สร้างบิวทานอลได้สูงสุด

Monot และ Engasser (1983) กล่าวว่า ในกรณีที่แหล่งคาร์บอน (กลูโคส) ต่ำมาก การจำกัดปริมาณแหล่งไนโตรเจน (แอมโมเนียม) จะเพิ่มผลผลิตตัวทำละลาย แต่การเติมแอมโมเนียมากเกินไป จะทำให้การหมักได้กรดมากกว่าตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียม ก็จะต้องจำกัดปริมาณกลูโคสด้วย จึงเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการสนับสนุนให้มีการสร้างตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนียมที่จะเปลี่ยนเป็นบิวทานอล ก็คือระดับความเข้มข้นของสับสเตรตที่จะเปลี่ยนเป็นระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั่นเอง

Pimpa และ Goma (1984) กล่าวว่า ในวิถีเมตาบอลิซึมของการสร้างบิวทานอลจากกลูโคสโดยไม่ผ่านกรดบิวทิริคนั้น จะวิเคราะห์ได้ว่า ในบางครั้ง *Clostridium* สามารถสร้างบิวทานอลจากกลูโคสได้โดยตรง โดยไม่ผ่านกรดบิวทิริค ซึ่งมีข้อเสียคือ นอกจากไม่มีการกำจัดกรดอะซีติกแล้วยังต้องใช้ $NADH+H^+$ มากขึ้นอีกด้วย

มณีนาฎ (2527) ได้ใช้เทคนิคสำหรับการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนโดยการวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น โดยทำการศึกษาการเจริญของ *Clostridium* (ใช้กลูโคสเป็นอาหาร) เปรียบเทียบระหว่างการวัดความขุ่นของเซลล์ (โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์) และการวัดปริมาตรของก๊าซ (โดยการแทนที่ของน้ำ) ซึ่งปรากฏว่าตัวแปรทั้งสองสอดคล้องกัน

2.3 กลีเซอรอล (Glycerol)

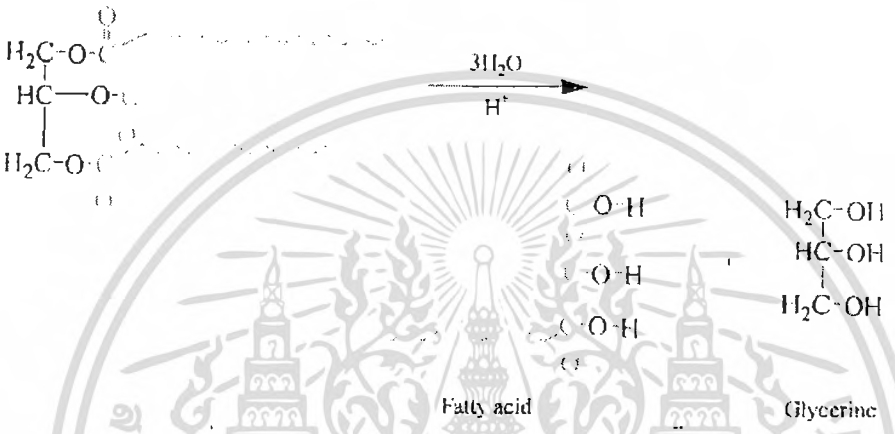
2.3.1 ประวัติของกลีเซอรอล

สารกลีเซอรอลถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (sponification) ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่ากลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบทุกชนิดโดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอรอลที่มีหมู่เอสเทอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เมื่อนำไขมันหรือน้ำมันมาแยกสลายด้วยน้ำในสภาวะกรดจะได้กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.5

ในช่วงแรก ได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตกาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้กาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี คศ.1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไนโตรกลีเซอรีน (nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม (อมร อุดเสน และคณะ, 2550)



รูปที่ 2.5 สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด
ที่มา : อมร และคณะ (2550)

2.3.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3 propanetriol เป็นแอลกอฮอล์อย่างง่าย (simple alcohol) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี เครื่องจักร เครื่องยนต์ อาหาร ยาสูบ เภสัชกรรม เยื่อกระดาษ เครื่องหนัง และสิ่งทอ แสดงดังตารางที่ 2.5 นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้น (feedstock) สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น ใช้ ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanedial) ได้อีกด้วย (Biebl และคณะ, 1998; 1999)

2.3.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

2.3.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางกายภาพตามตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีชื่อเรียกทางเคมีตามตารางที่ 2.7 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล

ด้านที่นำไปใช้ประโยชน์	การนำไปใช้ (ร้อยละ)			
	สหรัฐฯ (160,000 ตันต่อปี)	ยุโรป (190,000 ตันต่อปี)	ญี่ปุ่น (50,000 ตันต่อปี)	จีน[a] (80,000 ตันต่อปี)
ยา	39.5	23.1	34.0	5.2
ยาสูบ	15.8	2.5	5.3	7.3
กลีเซอรินไตรอะซีเตท (glycerintriacetate)	ND[b]	14.4	ND	ND
อาหาร	14.5	5.6	ND	ND
โพลีอีเทอร์แอลกอฮอลล์ (polyether acohol)	10.5	13.1	11.6	5.2
สี	9.2	13.1	19.5	49.0
เซลโลเฟน (cellophane)	2.0	4.4	3.8	1.5
ระเบิด (dynamite)	0.6	3.1	1.9	3.1
ยาสีฟัน	ND	ND	ND	16.0
เครื่องสำอาง	ND	ND	ND	6.3
อื่นๆ	7.9	20.6	23.9	7.2

หมายเหตุ [a] ข้อมูลส่วนใหญ่นำมาจากรายงานของศูนย์ข้อมูลวิศวกรรมเคมีแห่งประเทศจีน (Chinese Chemical Engineering Information Center)

[b] ND ย่อมาจาก no data (ไม่มีข้อมูล)

ที่มา : Wang และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวหนืด
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น-รส	ไม่มีกลิ่น แต่มีรสหวาน
น้ำหนักโมเลกุล	92.10 กรัมต่อโมล
ความหนืด	1,400 มิลลิปาสคาล วินาที
การละลาย	ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ ไดออกเซน และไม่ละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน
คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5 ที่ 20 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	17.8 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไอ	0.0025 มิลลิปรอท ที่ 50 องศาเซลเซียส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mallinckrodt Chemicals และ The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed.

Copyright © 2007, Columbia University Press

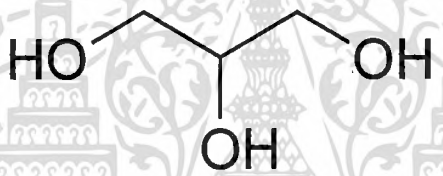
120209

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

ชื่อ IUPAC	1,2,3-Propanetriol หรือ 1,2,3-Trihydroxypropane
ชื่อทั่วไป	Glycerol ; Glycerin
ชื่อพ้องอื่นๆ	D-glycerol, L-glycerol, Glyceritol, Glycyl alcohol, Trihydroxypropane, Glycerin mist, Polyhydric alcohols, Propanetriol
สูตรโมเลกุล	$C_3H_5(OH)_3$

ที่มา: http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (25/04/2554)



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา: Richard, Rusty และ Myers (2007)

2.3.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

2.3.4.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซลซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่ หรือแม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ การปรับสภาพคุณสมบัติให้เป็นกรดเพื่อแยกชั้นของกลีเซอรอลกับไขมัน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อแยกตะกอนของเกลือออก จากการทดลองเมื่อทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลีเซอรอลมีความเป็นกรดอยู่ที่ pH 2–4 จะทำให้มีชั้นของกลีเซอรอลแยกออกมาร้อยละ 38–40 โดยน้ำหนัก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามมาตรฐาน BS 5711 จะพบว่ากลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์อยู่ที่ร้อยละ 80–85 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่ และสามารถเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลได้ และมาตรฐานของกลีเซอรอลที่แบ่งตามอุตสาหกรรมมีตามตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้

คุณลักษณะ	อุตสาหกรรม					มาตรฐานที่ใช้ทดสอบ
	เคมี	ไดนาไมต์	ยา	อาหาร	สบู่	
กลิ่น	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	-	BS 5711 :Part 19
กลีเซอรอล ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	99	99	95	99	80	BS 5711 :Part 3
น้ำ ร้อยละ โดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2097 - 1972
เถ้า ร้อยละ โดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	10	ISO 2098 - 1972
เถ้าซัลเฟต ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน	0.01	0.01	0.01	0.01	-	ISO 1616 - 1976
สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล ร้อยละ โดยน้ำหนักไม่เกิน	-	-	-	-	2.5	ISO 2464 - 1973
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 20°C/20 °C ที่อุณหภูมิ 25°C/25 °C	1.261ถึง 1.264	1.261ถึง 1.264	- 1.249	1.261ถึง 1.264	-	ISO 2099 - 1972
ความเป็นด่างหรือความเป็นกรด มิลลิอีคีวิเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.064	0.32	-	0.32	-	BS 5711 :Part 5
สารหนู มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	2	-	1.5	-	2	BS 5711 :Part 10
ตะกั่ว มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่เกิน	1	-	-	-	-	BS 2621 – 5
คลอไรด์ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่เกิน	-	0.01	0.01	0.01	-	BS 5711 :Part 12
สะพอนนิฟิเคชันอีควิเวเลนต์ มิลลิอีควิเวเลนต์ต่อ 100 กรัม ไม่เกิน	0.64	0.64	-	-	-	BS 5711 :Part 21

หมายเหตุ มาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงคุณลักษณะของกลีเซอรอล คือ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.337-2538)[13] และ British Standards Institution (BS 2621-5 : 1979)

ที่มา : มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์, มอก 377-2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลให้หมด มิฉะนั้นกลีเซอรอลจะไปอุดหัวฉีดและยังก่อให้เกิดปริมาณอัลดีไฮด์ในท่อไอเสียเครื่องยนต์ขณะเผาไหม้สูงกว่าปกติอีกด้วย โดยปกติการผลิตไบโอดีเซลแต่ละครั้งจะได้กลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10-15 โดยปริมาตร ซึ่งจะทำการอยกออกได้ด้วยการทำให้แยกชั้นออกจากไบโอดีเซลด้วยความแตกต่างของความหนาแน่น ไบโอดีเซลมีความหนาแน่น 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลมีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มี ผลทำให้กลีเซอรอลแยกตัวอยู่ชั้นล่างและไบโอดีเซลอยู่ชั้นบน ในส่วนของชั้นกลีเซอรอลยังคงมีสิ่งเจือปนอื่นได้แก่ ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทานอล หรือแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่และน้ำ เป็นต้น เป็นผลทำให้กลีเซอรอลที่แยกได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

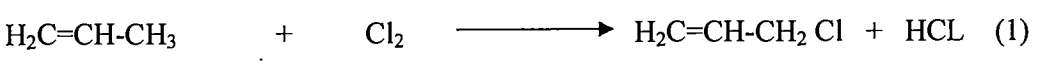
Yong และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณของสารดังนี้ กลีเซอรอล ร้อยละ 20.2 เถ้าร้อยละ 64.3 น้ำร้อยละ 3.0 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 12.4 และพีเอช (pH) 12.8 และเมื่อแยกสิ่งเจือปนโดยใช้กรดซัลฟิวริกแล้ว พบว่ากลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น กล่าวคือ ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 33.9 กรดไขมันดิบ (crude fatty acid) ร้อยละ 10.5 และเกลือ (salt) ร้อยละ 65.2 และยังพบว่า pH มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอล จากการปรับเปลี่ยนพีเอช (pH) ของสารละลายกลีเซอรอลจากพีเอช (pH) 1-7 พบว่าที่พีเอช (pH) 1-2 ให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์สูงสุด กล่าวคือ มีกลีเซอรอลร้อยละ 54 เถ้าร้อยละ 7.4 น้ำร้อยละ 7.5 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 31.1 หลังจากนำกลีเซอรอลดังกล่าวไปกลั่นแบบสุญญากาศอย่างง่าย (simple vacuum distillation) ที่ความดัน 4×10^{-1} ถึง 4×10^{-2} มิลลิบาร์ และ pH ต่ำกว่า 5 (เพื่อป้องกันการเกิดฟองจากสบู่ที่เกิดขึ้น) ได้กลีเซอรอลกลั่นตัวออกมาที่อุณหภูมิ 120-126 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ พบกลีเซอรอลบริสุทธิ์ร้อยละ 96.6 เถ้าร้อยละ 0.03 น้ำร้อยละ 2.4 และสารอินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 2.4 และมีพีเอช (pH) เท่ากับ 3.5

2.3.4.2 กระบวนการทางเคมี (Myers และ Myers, 2007)

ในปี ค.ศ. 1940 มีความต้องการกลีเซอรอลจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เพื่อใช้ในการผลิตสบู่และเทียน ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 เริ่มมีการผลิตกลีเซอรอลโดยวิธีการหมักจากน้ำตาลเป็นหลัก นอกจากนี้ยังมีผลิตจากกระบวนการทางเคมีซึ่งสังเคราะห์มาจากโพรไพลีน (propylene) โดยการสังเคราะห์จากโพรไพลีนมีขึ้นครั้งแรกก่อนสงครามโลกครั้งที่ 2 และการผลิตในเชิงการค้าเริ่มต้นขึ้นในปี ค.ศ. 1943 โดยประเทศเยอรมนี

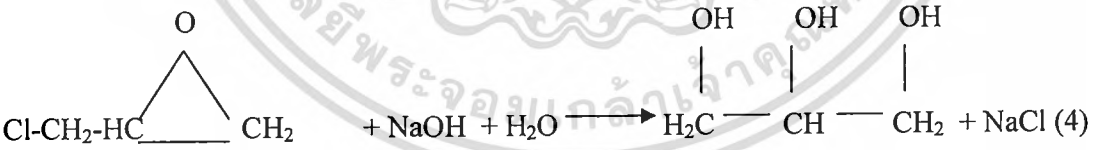
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์กลีเซอรอลทางเคมีนั้นเริ่มจากการที่คลอรีนเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของโพรไพลีน ได้เป็นสารอัลลิลคลอไรด์ (allyl chloride) ตามสมการที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรดไฮโปคลอรัสจะได้เป็น 1,3 ไดคลอโรไฮดริน (1,3 dichlorohydrin) ดังสมการที่ 2



จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม หรือแคลเซียมไฮโดรออกไซด์ลงใน 1, 3 ไดคลอโรไฮดริน จะได้ อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ดังสมการที่ 3

ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ (4)



การสังเคราะห์อีกทางหนึ่ง คือ อัลลิลคลอไรด์ถูกไฮโดรไลส์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ (H_2C=CH-CH_2-OH) จากนั้นเติมคลอรีนจะได้โมโนคลอโรไฮดริน (Monochlorohycrin) และไดคลอโรไฮดริน (Dichlorohydrin) ซึ่งทั้งสองจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตให้กลีเซอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.3 กระบวนการทางชีวภาพ

da Silva และคณะ (2009) กล่าวถึงปิโตรเลียมเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดในโลก แต่มีลักษณะที่ต้องใช้อย่างจำกัด จึงทำให้ต้องหาแหล่งพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นที่สนใจกันอย่างมาก อย่างเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) เช่น เอทานอล และไบโอดีเซล ซึ่งเต็มไปด้วยแหล่งต่างๆ เพื่อไปแทนที่ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) ไบโอดีเซลสามารถแทนที่ปิโตรเลียมดีเซล (petroleum diesel) ผลิตจากไขมันสัตว์และน้ำมันพืช ซึ่งสร้างกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ (by product) ประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนเกินของกลีเซอรอลที่ถูกสร้างขึ้นอาจจะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งกลีเซอรอลไม่สามารถถูกจัดการให้หมดไปในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ที่จะมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ โดยอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และ/หรือแหล่งพลังงานจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นสารเคมีโดยใช้กระบวนทางชีวภาพให้มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) ไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) เอทานอล (ethanol) ซัคซิเนท (saccinate) เป็นต้น

เพราะฉะนั้น จึงมีการศึกษาการผลิตสารกลีเซอรอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ เพื่อลดการใช้ปิโตรเลียม ดังนี้ Benito และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเพคเบด (packed bed) โดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตเป็น 36.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง (pH) 6.9 และมีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เป็น 1.22 ต่อชั่วโมง

Bisping และ Rehm (1986) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกตรึงอยู่ในซินเตอร์กลาส (sintered glass) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-100 ไมโครเมตร พบว่าซินเตอร์กลาส (sintered glass) มีความสามารถในการกักเก็บเซลล์ได้ดี ซึ่งเมื่อทำการผลิตกลีเซอรอลในสภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) 8 รอบ จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ 26.2 ถึง 29.5 กรัมต่อลิตร

Guo และคณะ (2006) ศึกษาผลกระทบของสารควบคุมแรงดันออสโมติกชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกลีเซอรอลของยีสต์ *Candida krusei* ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โพลีเอทิลีนไกล-คอล 4000 (PEG 4000) และกลีเซอรอล (glycerol) พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 179 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารควบคุมแรงดันออสโมติกเป็นกลีเซอรอล ได้ความเข้มข้นเพียง 80 กรัมต่อลิตร และในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารควบคุมแรงดันออสโมติกสามารถผลิตกลีเซอรอลได้เพียง 41 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhuge และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดย *Candida glycerinogenes* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมติกสูง (osmotolerance yeast) ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกลีเซอรอลคือ ที่อุณหภูมิ 29-33 องศาเซลเซียส และพีเอช (pH) 4-6 โดยอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตกลีเซอรอล ประกอบไปด้วยกลูโคส 230-250 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีฟอสเฟตประกอบ 55-65 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีผลได้ของกลีเซอรอลสูงสุดเป็นร้อยละ 64.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดเป็น 137 กรัมต่อลิตร

Yalcin1 และ Ozbas (2008) ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการเจริญเติบโต และจลนพลศาสตร์ของการผลิตกลีเซอรอลแบบกะของเชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 และ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 โดยทำการศึกษาปริมาณหัวเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 2.5 สำหรับสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik1 จะทำให้สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 8.6 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้ออยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 2.5-7.5 จะสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 7.6 กรัมต่อลิตร

Spencer และคณะ (1956) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Aerobacter aerogenes* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 3.2-4.8 และเมื่อทำการศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Torulopsis magnoliae* พบว่ากลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์เดียวที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก และผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 17

Liu และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าของเชื้อ *Candida krusei* พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ 40 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกลีเซอรอลจาก 16.5 เป็น 47.7 กรัมต่อลิตร

ทั้งนี้ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอลสรุปอยู่ในตารางที่ 2.9

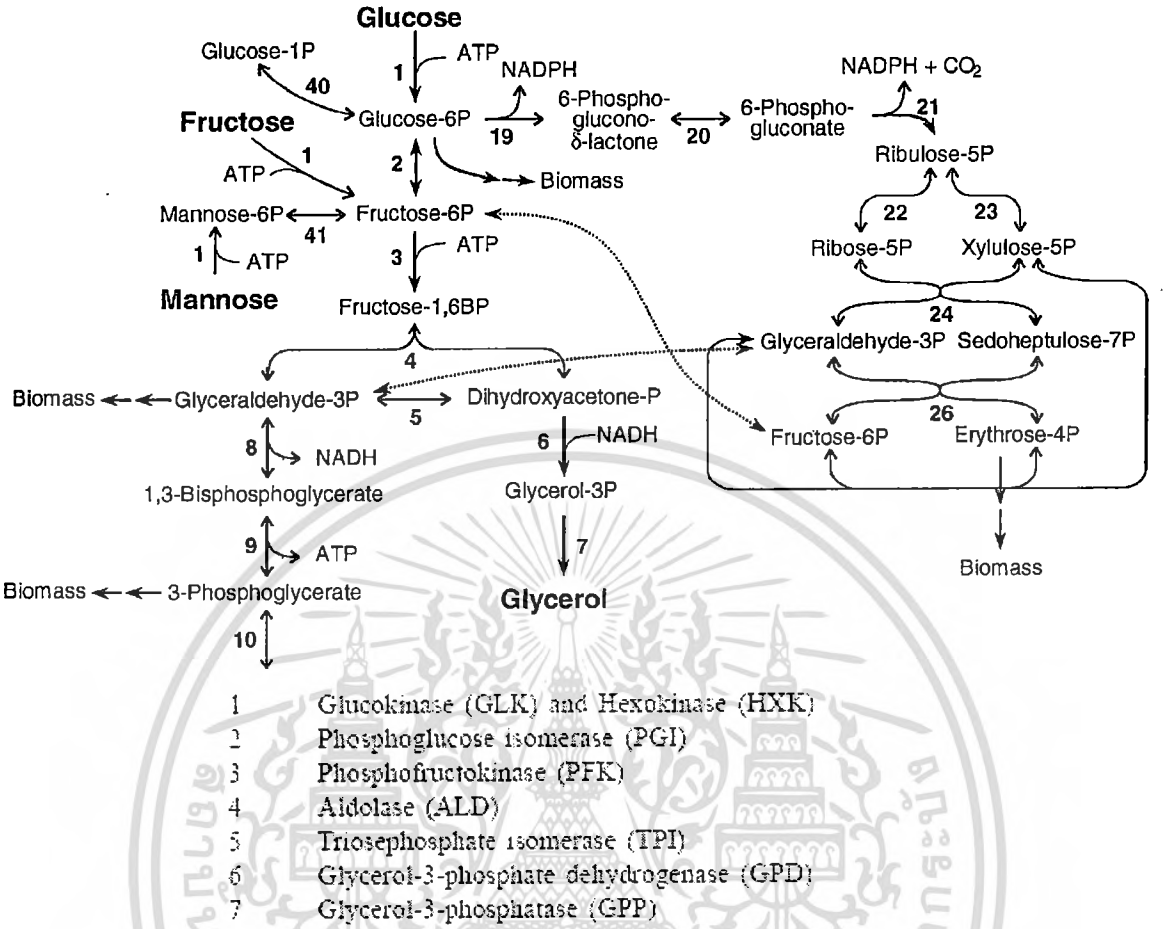
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล

สายพันธุ์	สารตั้งต้น	กระบวนการ/ระดับการผลิต	ความเข้มข้นกลีเซอรอลในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล)	อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	เอกสารอ้างอิง
ยีสต์						
S. cerevisiae	กากน้ำตาล	Batch sulfite/ 12 ลิตร	55	25	11.5	Cocking และ Liliy, 1919
	กลูโคส	Batch insoluble sulfite/ 2.5 ลิตร	35	23	11.6	Underkofler, 1954
	กลูโคส	Continuous sulfite/pilot plant	50	28	33	Freeman และ Donald, 1957a
	กากน้ำตาล	Fed batch sulfite/vacuum, CO_2 sparing	80	25	30	Kalle และคณะ, 1985
	กลูโคส	Batch alkali steered/ 12 ลิตร	45	23	9	Shade และ Farber, 1947
C. magnoliae I_B[a]	กลูโคส	Aerobic batch process/ shake flask	79[b]	43	20	Spencer และ Shu, 1957
	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 60 ลิตร	170	ND[c]	17	Peterson และคณะ, 1958
P. farinose	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 1ลิตร	300	ND	75	Vijaikishore และ Karanth, 1986a
C. glycerinogens	กลูโคส	Aerobic batch process/ จาก shake flask ถึง 50,000 ลิตร	110-130	52-63	28-32	Zhung และ Fang, 1995
แบคทีเรีย						
B. subtilis	กลูโคส	Batch/shake flask	14.7	29	2	Neish และคณะ, 1945
สาหร่าย						
D. tertiolecta	CO_2	Batch	0.12	ND	0.066	Ben-Amotz และ Avron, 1981

ที่มา : Wang และคณะ (2001)

2.3.5 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล



รูปที่ 2.7 เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล

ที่มา : Mostafa (1995)

รูปที่ 2.7 เป็นเมทาบอริซึมของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ เช่น ยีสต์ และแบคทีเรียอย่าง *Lactobacillus lycopersici* กับ *Bacillus subtilis* ส่วนจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะไม่มีอากาศกับกลีเซอรอลซึ่งมีบทบาทเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน มีมากมายหลายชนิด เช่น *Citrobacter freundii* (Homann และคณะ, 1990; Daniel และคณะ 1995; Seifert และคณะ, 2001) *Klebsiella pneumoniae* (Forage และ Foster, 1992; Tong และคณะ, 1991; Menzel และคณะ, 1997b; Biebl และคณะ, 1998; Németh และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium pasteurianum* (Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998; Biebl, 2001) *Clostridium butyricum* (Abbad-Andaloussi และคณะ, 1995; Biebl, 1991; Biebl และคณะ, 1992; Himmi และคณะ, 1999; Malaoui และ Marczak, 2001; Colin และคณะ, 2001) *Enterobacter agglomerans* (Barbirato และ

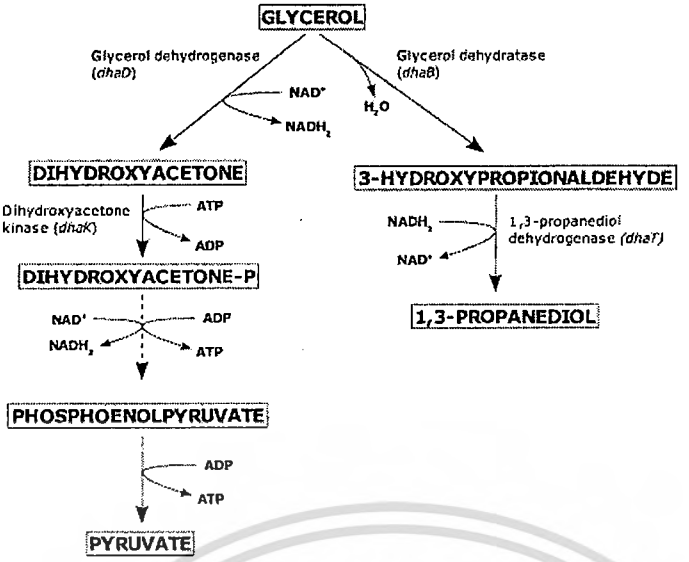
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ, 1996; Bories, 1997; Barbirato และคณะ, 1997a) *Enterobacter aerogenes* (Ito และคณะ, 2005) และ *Lactobacillus reuteri* (Talarica และคณะ, 1988, 1990)

ในรูปที่ 2.8 *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* และ *Enterobacter* กลีเซอรอลถูกใช้ในเมทาบอลิ-ซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้ ทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน(oxidation) และรีดักชัน (reduction) (Zhu และคณะ, 2002) ใน oxidative pathway จะมี NAD^+ ไม่อิสระ เอนไซม์ glyceroldehydrogenase (EC 1.1.1.6) กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลีเซอรอลไปเป็น dihydroxyacetone และถัดมาเอนไซม์ dehydroxyacetone kinase (EC 2.7.1.29) เร่งปฏิกิริยาการผลิต phosphorylates (Daniel และคณะ, 1995; Luers และคณะ, 1997; Macis และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) ส่วน reducing pathway จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ glycerol dehydratase (EC 4.2.1.30) ที่ต้องการโคเอนไซม์เป็นวิตามินบี 12 (coenzyme B_{12}-dependent) และเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ diol dehydratases (EC 4.2.1.28) (Toraya และคณะ, 1978; Forage และ Foster, 1982; Knietsch และคณะ , 2003) กลีเซอรอลถูกเปลี่ยนไปเป็น 3-hydroxy propionaldehyde (Toraya และคณะ, 1980; Tong และคณะ, 1991; Seifert และคณะ, 2001) และเอนไซม์ 1,3-propanediol dehydrogenase (1,3-propanediol-oxydoreductase, EC 1.1.1.202) ที่ต้องการ $NADH+H^+$ ($NADH+H^+$ dependent) จะทำการรีดิวซ์ 3-hydroxypropionaldehyde ไปเป็น 1,3-propanediol และสร้าง NAD^+ ขึ้นใหม่ (Macis และคณะ, 1998; Skraly และคณะ, 1998; Ahrens และคณะ, 1998; Veigo da Chuha และ Foster, 1992; Németh และคณะ, 2003) ดังรูปที่ 2.10 ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ 1,3-propanediol (1,3-PDO) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการหมักกลีเซอรอล (Homann และคณะ, 1990; Deckwer, 1995)

ใน *K. pneumoniae* (Forage และ Lin, 1982) และ *C. freundii* ลำดับการเรียงตัวของยีนสุดท้ายทำหน้าที่เชื่อมโยงและกระตุ้นเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB*), 1,3-PDO dehydrogenase (*dhaT*), glycerol dehydrogenase (*dhaD*), และ dihydroxyacetone kinase (*dhaK*) ซึ่งถูกล้อมรอบโดย *dha* regulon (Zhu และคณะ, 2002) ดังรูป 2.4 สำหรับกลุ่มยีน 1,3-PDO ของ *C. butyricum* จะประกอบด้วย 3 ยีนที่แตกต่างกัน คือเอนไซม์ glycerol dehydratase (*dhaB1*), เป็นตัวกระตุ้นโปรตีน (*dhaB2*) และ *dhaT* (Raynaud และคณะ, 2003) ในแบคทีเรียนี้ เอนไซม์ glycerol dehydrogenase มีความว่องไวต่อออกซิเจนอย่างรุนแรง ซึ่งจะร่วมกับผนังเซลล์ของวิตามินบีสิบสองอิสระ (vitamin-B_{12} independent) (Saint-Amans และคณะ, 2001; Raynaud และคณะ, 2003; Gonzalez-Pajuelo และคณะ, 2004, 2005a,b, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO

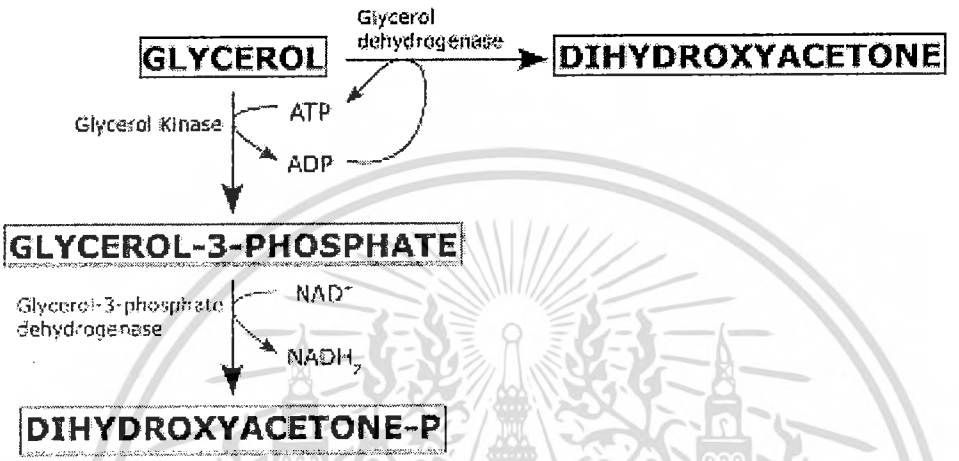
ที่มา : Bouvet และคณะ (1995); Barbirato และคณะ (1997b); Menzel และคณะ (1997a); Biebl (2001)

ใน *S. cerevisiae* และจุลินทรีย์อื่นๆ กลีเซอรอลจะถูกแยกเป็น dihydroxyacetone หรือ glycerol-3-phosphate ตามรูปที่ 2.9 (Wang และคณะ, 2001) จากสารหลังนั้น กลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็น glycerol-3-phosphate ผ่านเอนไซม์ glycerol kinase (EC 2.7.1.30) ขณะที่สามารถใช้อันใดอันหนึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไขมันหรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydroxyacetone phosphate และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) ในปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือสามารถนำมาให้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เมทาบอลิซึมอื่นๆ (Wang และคณะ, 2001) เหมือนวิถีสำหรับ glycerol oxidation (*glp* regulon) ถูกแสดงใน *K. pneumoniae* (Ruch และคณะ, 1974; Forage และ Lin, 1982) *Gluconobacter oxydans* (Bories และคณะ, 1991; Claret และคณะ, 1994) และ *C. acetobutylicum* (Gonzalez- Pajuelo และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.5 ตามด้วย Ruch และคณะ (1974) ซึ่งวิถี glycerol-3-phosphate เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะที่มีอากาศของกลีเซอรอลใน *K. pneumoniae* (เปลี่ยนชื่อมาจาก *K. aerogenes*) ขณะที่วิถี dihydroxyacetone เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะไม่มีอากาศของสารตั้งต้นนี้

การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C. pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับการสร้างเป็นผลพลอยได้ (by-product) (Biebl, 2001) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ในวิถี (Biebl และคณะ, 1998) อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการ redox-balanced เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น succinic acid แม้ว่าวิถีสำหรับเอทานอลและ saccinate มีค่าเท่ากับ redox-balanced ที่เกี่ยวโยงกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิถี ethanologenic สูงมาก คือ 1ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละโมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิถี saccinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง proton motive force โดย fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.11

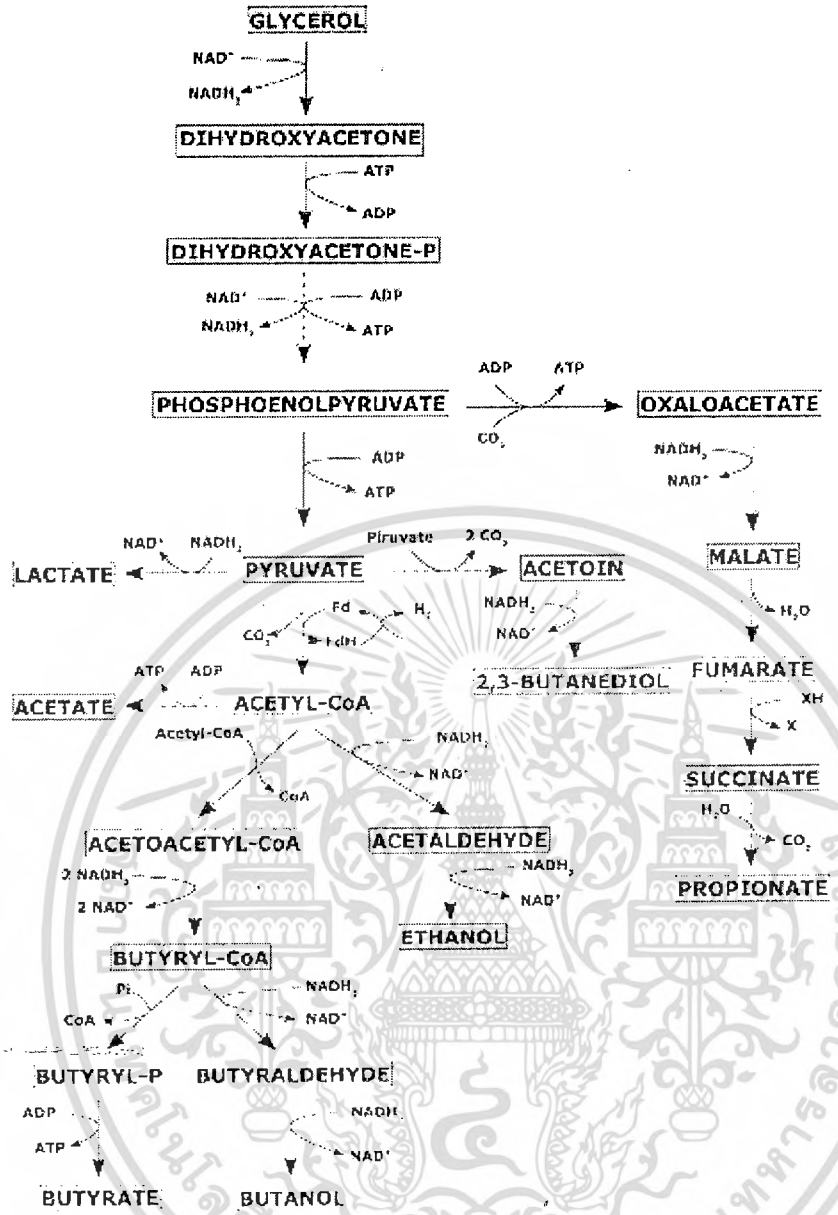


รูปที่ 2.9 วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate

ที่มา : Bories และคณะ (1991) และ Claret และคณะ (1994)

กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีแอลกอฮอล์ น้ำมัน มอนอกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ สบู่ และสิ่งสกปรกอื่นๆ ปนกันอยู่ การทำกลีเซอรีนบริสุทธิ์ทำได้โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรด เพื่อให้กลายเป็นกรดไขมันและเกลือ พร้อมทั้งเติมสารละลายเฮกเซนเพื่อละลายสิ่งเจือปนต่างๆ ให้แยกออกจากชั้นกลีเซอรีน จากนั้นนำกลีเซอรีนไปเติมผงถ่านและกรองออก จะได้กลีเซอรีนที่ใสสะอาด เมื่อกลั่นเอาแอลกอฮอล์ออก ก็จะได้กลีเซอรีนบริสุทธิ์ในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล

ที่มา : da Silva และคณะ (2009)

การผลิตไบโอดีเซลจึงยังเป็นกระบวนการที่ไม่คุ้มค่าการลงทุน ดังนั้นในการที่จะขยายกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปสู่ระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นจะต้องมีการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้ โดยในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันนั้นจะเกิดกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์แนวหนึ่ง คือ การทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลนั้นต่อไป กลีเซอรอลที่บริสุทธิ์จะมีราคาสูงกว่าเมทิลเอสเตอร์

กลีเซอรอลเป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของการหมักเอทานอลจากกลูโคสหรือเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการที่มีขั้นตอนเริ่มต้นจากไขมันพืช และไขมันสัตว์ มีแบคทีเรียจำนวนมากหมักกลีเซอรอลไปสู่สารเคมี เช่น บิวทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซิติก และกรดแลคติค ตามรูปที่ 2.10 อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิตไบโอดีเซลคือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารมูลค่าเพิ่ม โดยการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นบิวทานอล ซึ่งเป็นตัวเด่นที่สุด

2.4 กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

บิวทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนหมักแบบไม่ใช้อากาศโดยแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* และ *C saccharoperbutylacetonicum* เป็นต้น โดยทั่วไปแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สามารถหมักแป้ง น้ำตาลเฮกโซส หรือเพนโตส เป็นอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ได้โดยผลิตในอัตราส่วน 6:3:1 (Spivey, 1978)

แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ลักษณะตามตัวอย่างแบคทีเรียในจีนัสตามรูปที่ 2.11 เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิลิตร เป็นพวกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobes) หรือมีบางพวกเป็นแบคทีเรียที่ทนอากาศ (aerotolerant) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว มีความสามารถในสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย ตามรูปที่ 2.12 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น การขาดสารอาหาร เป็นต้น สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อความร้อน ความแห้ง และสารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมทาบอริซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงัก จนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ (จริยา, 2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.11 ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

รูปที่ 2.12 ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด (blood agar) และ อาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง (egg yolk agar) ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจากอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด สามารถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์เลซิทิเนส (lecithinase) โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากความเป็นเงา (iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสนาน 10-15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *Clostridium* จะเปลี่ยนกลูโคสได้เป็นกรดที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้

เชื้อ *Clostridium* เป็นพวกที่ไม่มีระบบไซโตรโครม และกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสร้างสารพลังงาน ATP ดังนั้นการได้มาซึ่ง ATP จึงต้องผ่านกระบวนการ ซับสเตรท-เลเวล-ฟอสโฟ-รีเลชั่น (substrate- level-phosphorylation) . การจัดจำพวกในระดับจีนัสออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ จะใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้สารชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *C. cellodioparum* และ *C. thermocellum* สามารถหมักเซลลูโลสแล้วให้ผลเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) กรดซัคซินิค (succunic acid) เอทานอล (ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2) ส่วน *C .butyricum C. pasteurianum C .perfringens* และ *C .acetobutylicum* หมักน้ำตาล แป้ง และแพคติน ให้ผลลัพธ์เป็นอะซีโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) กรดบิวทิริค (butyric acid) กรดอะซีติก (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2)

2.4.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก

ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นเรียกช่วงนี้ว่า อะซิโดจีนิซิสเฟส (Acidogenesis phase) โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซี-ติลโคเอ (acetyl CoA) และอะซีติลโคเอ จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) และบิวไทริลโคเอ (butyryl CoA) ก่อนเปลี่ยนเป็นกรดบิวทิริก (butyric acid) ในช่วงนี้ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง จากนั้นแบคทีเรียจะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวทำละลายต่างๆ โดยกรดอะซีติกจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีโตน ส่วนกรดบิวทิริกจะถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และอะซิติลโคเอเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (acetyldehyde) ซึ่งอะซิทัลดีไฮด์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล เรียกช่วงนี้ว่า โซลเวนโทจีนิซิสเฟส (Solventogenesis phase) ในขั้นตอนนี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นและจะมีการนำกรดอินทรีย์มาใช้เป็นบางส่วน ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ อะซิโดจีนิซิสเฟสเปลี่ยนเป็น โซลเวนโทจีนิซิสเฟส เรียกว่า จุดเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่าง (pH transition point) หรือ จุดยุติค่าความเป็นกรดด่าง (pH break – point) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากรดอินทรีย์ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นด้วย วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล แสดงดังรูป 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณบิวทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญและองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่นๆ

2.4.3.1 สารตั้งต้น

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Clostridium* วัสดุที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลและสารคาร์โบไฮเดรตในรูปต่างๆ ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและโพลิเมอร์ ซึ่งอาจจำแนกได้ดังนี้ ประเภทที่หนึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวเหนียว ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันเทศ เป็นต้น ประเภทที่สอง เป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาล หางนม เป็นต้น และประเภทที่สาม เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าวและซังข้าวโพด เป็นต้น

Robinson (1922) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส แลคโตส แป้ง และเดกตรินเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ส่วนกาแลคโตส ไซโลส อะราบิโนส ราฟฟิโนส เมเลซิโตส อินนูลิน แมนนิทอลถูกใช้ไปเพียงบางส่วน และน้ำตาลทรีฮาโลส แรมโนส เมลิไบโอส กลีเซอรอล ไม่ถูกใช้ในการหมัก

หากใช้น้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียชนิดนี้จะมีวิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ตามรูปที่ 2.13

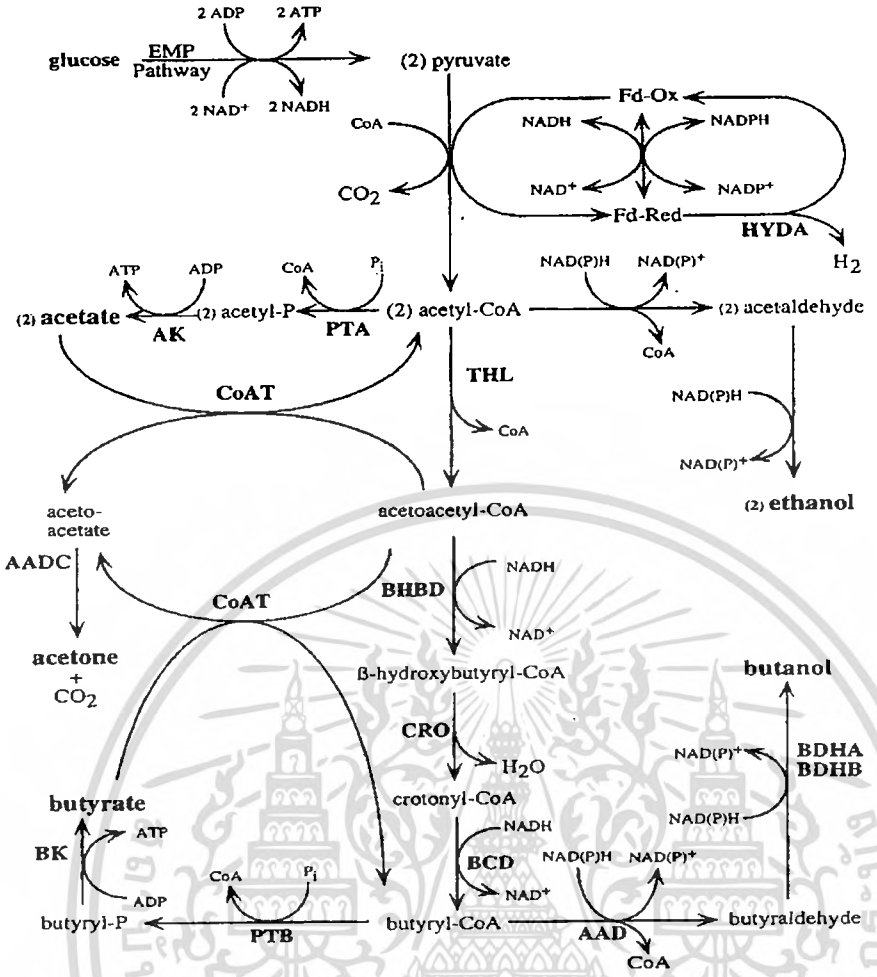
2.2.3.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ในการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล มีรายงานว่า การกำจัดปริมาณคาร์บอนเป็นอันตรายต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้การจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดในขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2.2.3.3 อุณหภูมิ

McCutchan และ Hickey (1954) ทำการศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อัตราผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมัก มีรายงานว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30 องศาเซลเซียสและ 33 องศาเซลเซียส แต่การผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองคล้ายกับการทดลองการหมักในอาหารสังเคราะห์ (synthesis medium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส (phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต- บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-COA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส(butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)

ที่มา: Ruchir และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.4 ออกซิเจน

O' Brien และ Morris (1971) ศึกษา *C. acetobutylicum* ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะไม่มีอากาศ การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหนักที่มีความต่างศักย์รีดอกซ์ ในช่วงระหว่าง -250 ถึง -400 มิลลิโวล์ท การสัมผัสกับออกซิเจนในน้ำหมักแบบไร้อากาศไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดในระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60 ไมโครโมลาร์) การใช้กลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง อัตราการเจริญ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จุลินทรีย์จะมีพลังงานน้อยลง และมีการผลิตบิวทาเรทแต่ไม่มีการผลิตอะซีเตท และจะหยุดการผลิตทำให้ปริมาณ ATP ในเซลล์ลดลง การเจริญและเมทาบอลิซึมจะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก

2.2.3.5 ระดับความเป็นกรดด่าง (pH)

ในน้ำหมักความเป็นกรดด่างจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล หากรักษาระดับความเป็นกรดด่างของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรด ในทางตรงข้ามถ้ารักษาค่าความเป็นความเป็นกรดด่างไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์อย่างไรก็ตามช่วงของความเป็นกรดด่างที่จะทำให้มีการผลิตสารละลายอยู่ในช่วงกว้าง ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะในการหมัก (Jones และWoods, 1986) ช่วงความเป็น กรดด่างที่มีการสร้างสารละลายมักอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.8-5.5 (Bahl และคณะ, 1982)

2.2.3.6 วิตามิน

ไบโอติน (biotin) และกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างอะซีโตน-บิวทานอล ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ในสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือวัตถุดิบที่ประกอบไปด้วยวิตามินที่จำเป็น (essential vitamin) (นวลจันทร์ และสุวิญชา, 2548)

2.2.3.7 Clostridial degeneration

กลไกการเกิดความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์บ่งชี้ได้จาก (1) การสร้างกรดที่มากเกินพอระหว่างการเจริญในช่วง การเติบโตแบบทวีการ(exponential phase) ซึ่ง Eva และคณะ (1995) ได้รายงานว่า *C. beijerinckii* NCIMV 8052 มีการใช้กลูโคสในการหมักซึ่งจะได้กรดอะซีติกและกรดบิวทาริก ในอัตราที่มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ความเป็นกรดด่างลดลงและเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในช่วงของการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis phase) ได้และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น (2) Hugh และ Chen ในปี 1995 ได้คัดแยกสายพันธุ์กลายของ *C. beijerinckii* NCIMV 8052 ซึ่งมีความทนทานต่อความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำละลายอินทรีย์ (3) มีการคาดคะเนว่ายีนควบคุมของ *C. beijerinckii* ที่มีการสูญเสียสภาพแล้วไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ในการเพาะเลี้ยงแบบ คีโมสแตท(chemostat) และ (4) เซลล์ที่เสียสภาพจะแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องในการหมักแบบต่อเนื่องขณะที่เซลล์ที่ไม่เสียสภาพจะหยุดแบ่งตัวแล้วเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอนโดสปอร์

2.5 สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiales
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*

Clostridium เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิเมตร เป็นพวก Obligate anaerobes หรือมีบางพวกเป็น Aerotolerant ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์ทนความร้อนได้ดีสามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงใน Blood agar และ Egg yolk agar ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง โคโลนีจาก Blood agar สามารถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญใน Egg yolk agar สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lecithinase โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lipase โดยดูจากความเป็นเงา (Iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 10 - 15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (Subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร Thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24 - 48 ชั่วโมง เชื้อ *Clostridium* จะเปลี่ยนกลูโคสได้เป็นกรดที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำตัวอย่างใส่ใน Chopped meat medium ปิดฝาสนิทด้วย Pertrolatum หลังจากบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึง Subculture ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะสำคัญของ *Clostridium* แต่ละสปีชีส์ คือ ความสามารถในการ Ferment น้ำตาลต่างชนิดกันได้ นอกจากนี้ *Clostridium* บางชนิดยังสามารถให้ก๊าซมากพอ ที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้ *Clostridium* sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน ตามพืชผักต่างๆ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ ในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Clostridium botulinum* เป็นสาเหตุสำคัญของโบทูลิซึม (Botulism) *Clostridium tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (Tetanus) และ *Clostridium perfringens* ทำให้เกิดก๊าซแกงกรีน (Gas Gangrene)

โรคที่เกิดจาก *Clostridium*

Clostridium botulinum Clostridium perfringens และ *Clostridium tetani* มี Exotoxin ที่รุนแรงสามารถที่จะทำให้เกิดโรคที่ร้ายแรงได้ คือ โรคอาหารเป็นพิษ Botulism gas gangrene และบาดทะยัก

2.5.1 *Clostridium acetobutylicum*

รูปที่ 2.14 ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*
ที่มา : www.scribemedia.org/2007/09/18/nanologix-clostridia/ (25/04/2554)

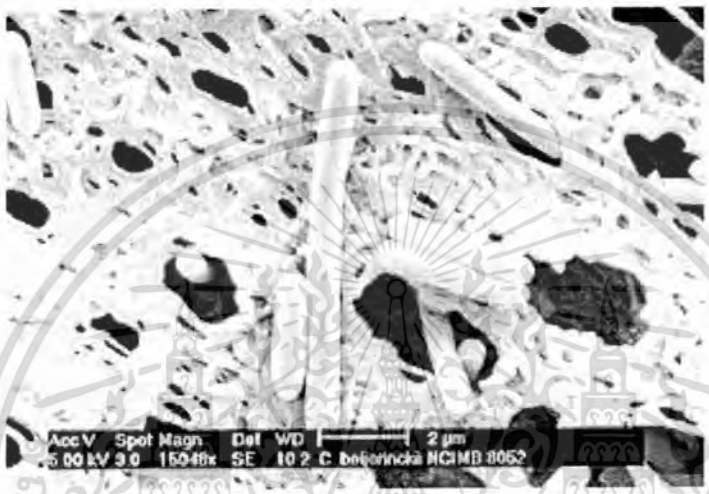
Clostridium acetobutylicum รูปร่างเป็นแท่งตรง ตามที่แสดงในรูปที่ 2.14 เคลื่อนที่โดยใช้ pertrichous flagella สปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ สีขาวเทา โปร่งแสงเป็นมัน เจริญได้เล็กน้อยในอาหาร NB แต่ถ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อมักจะเจริญได้ดี หมักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีกรดอะซิติก บิวทิวริก บิวทานอล และสร้างอะซีโตน สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจน พบทั่วไปในดิน

Clostridium acetobutylicum อยู่ในจีนัส *Clostridium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเชิงการค้าอย่างมาก บางครั้งสามารถเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า "Wiezmann Organism" ซึ่งเป็นชื่อที่ตั้งตาม Chiam Weizmann ที่ผู้ค้นพบแบคทีเรียชนิดนี้ในปี 1916 เขายังค้นพบอีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clostridium acetobutylicum นั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแป้งโดยใช้กระบวนการ ABE (Acetone Butanol Ethanol process) ในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตดินปืน และดินระเบิด กระบวนการ ABE กลายมาเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมจนกระทั่งปลายปี 1940 เมื่อน้ำมันมีราคาลดลงทำให้มีผลกระทบอย่างมากต่อกระบวนการพื้นฐานของการแยกไฮโดรคาร์บอน และเทคนิคการกลั่นปิโตรเลียม *Clostridium acetobutylicum* ยังสามารถผลิตกรดอะซีติก กรดบิวทีริก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน

2.5.2 *Clostridium beijerinckii*



รูปที่ 2.15 ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน
ที่มา : http://genome.jgi-psf.org/clobe/clobe.home.html (11/03/2554)

Clostridium beijerinckii เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ดังแสดงในรูปที่ 2.15 สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำการแยกได้จากอุจจาระและในดิน จะมีการสร้างสปอร์เป็นรูปท่อนป้องมีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ในระดับอุตสาหกรรมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น บิวทานอล อะซีโตน และไอโซโพรพานอล ณ สภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 °C จะมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีความหลากหลาย(ไม่จำกัดจำนวน) ซึ่งรวมถึง เพนโตส เฮกโซส และแป้ง ข้อดีของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ มีความสามารถในการเติบโตที่ง่าย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพงในการเพาะเลี้ยง มีความเสถียรของสายพันธุ์ที่ทนต่อการเสื่อมสภาพ มีการปรับตัวดีในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง และตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในระยะ Log phase เป็นต้น *Clostridium beijerinckii* สามารถหมักแป้งได้เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ และ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย นอกจากนี้*Clostridium beijerinckii* บางสายพันธุ์จะผลิตไอโซโพรพานอลออกมาด้วยนอกเหนือจากอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนี้สามารถกำหนดสภาวะให้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการได้ รวมทั้งยังศึกษาความเป็นไปได้ที่จะมีประยุกต์ใช้เศษวัตถุดิบเหลือใช้มาประยุกต์ใช้เพื่อทำการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่างๆ เพื่อเป็นการลดต้นทุนด้านวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโดยทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง รวมไปถึงช่วยลดปัญหามลภาวะที่มาจากเศษวัตถุดิบ เหลือใช้จากทางการเกษตร

จิรกานต์และคณะ (2544) ศึกษาพัฒนา เทคโนโลยีการผลิต n-butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium butylicum* NRRL B592 และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบ มันสำปะหลังสด มันสำปะหลังหลังย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งมันสำปะหลัง และผักตบชวาหลังย่อยด้วยกรด ผลจากการทดลองพบว่าการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดที่ค่าน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ให้บิวทานอลสูงสุด (11.1-11.3 กรัมต่อลิตร) การเพิ่มผลผลิตสามารถทำโดยการพัฒนากระบวนการผลิต จากการทดลองหมักอะซีโตน บิวทานอลแบบต่อเนื่องที่มีการเวียนกลับของเซลล์สามารถทำให้อัตราการผลิตเป็น 20 เท่าของแบบครั้งคราว และ 4.6 เท่าของแบบต่อเนื่อง พบว่าภาวะที่เหมาะสมคือที่ความเข้มข้นน้ำตาล 52 กรัมต่อลิตร

Gheshlaghi และคณะ (2009) เป็นบทความที่กล่าวถึงเมทาบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย (heterofermentative) สร้างสปอร์ได้ (Girbal และ Soucaille, 1994) การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) แบบแบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอริซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตตและบิวทาเลต กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

ในกระบวนการหมักขั้นที่สอง (BalLongue และคณะ, 1985) กรดที่เกิดขึ้นมาก่อนหน้านี้จะกลับเข้าไปยังเซลล์ และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrates) สำหรับการผลิตสารละลายที่เป็นกลาง (Fond และคณะ, 1985; Kell และคณะ, 1973) เมื่อมาถึงในขั้นตอนนี้ กระบวนการผลิตกรดจะสิ้นสุดลงพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะสิ้นสุดลงเช่นกัน และค่า pH ของอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

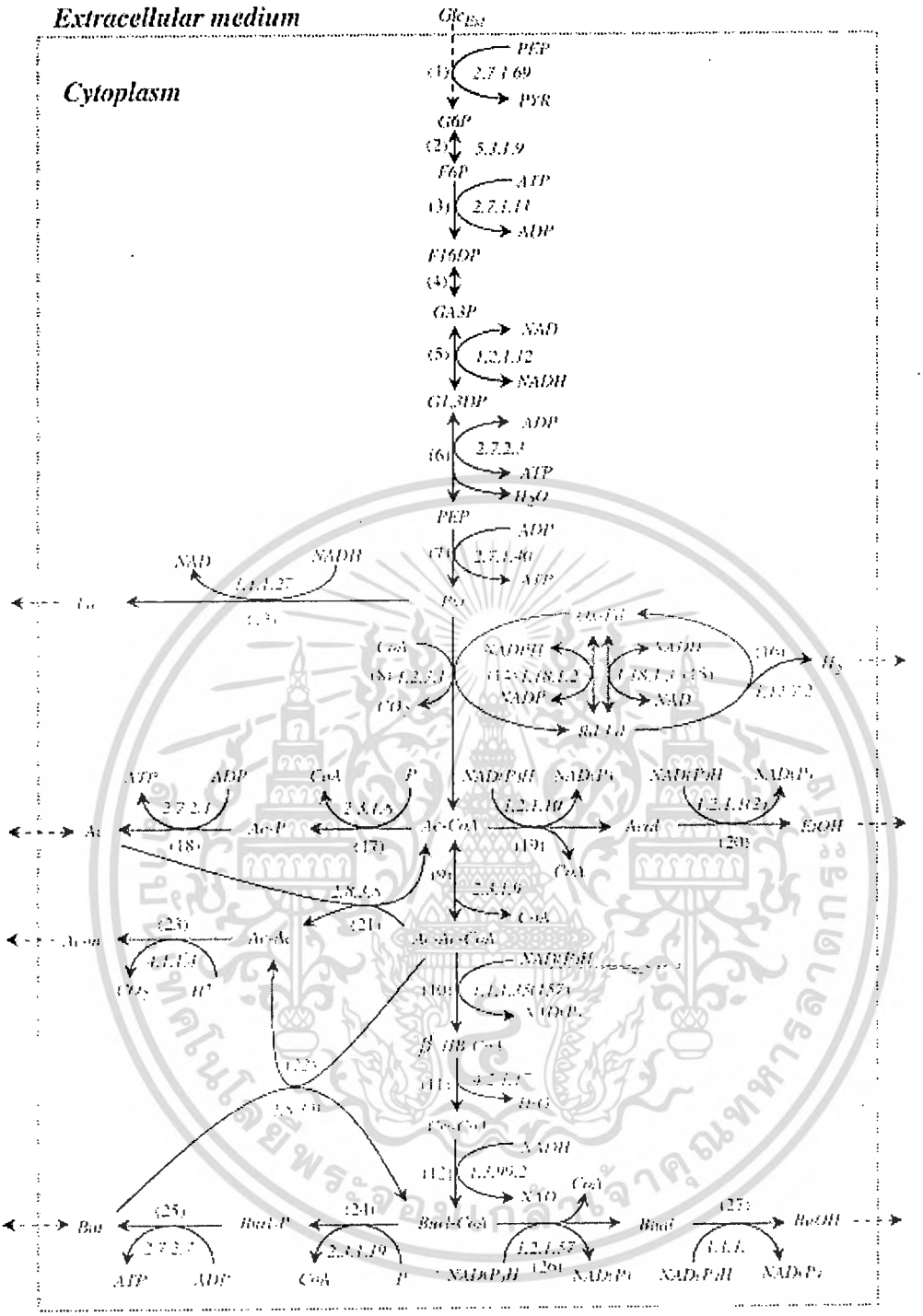
จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดถูกดูดกลืนเข้าไปในเซลล์ (Terracciano และ Kashket, 1986; Spivey, 1978) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนไปของกระบวนการผลิตสารละลายนั้น คือการที่เซลล์ปรับตัวเพื่อตอบสนองต่ออาหารที่มีค่า pH ต่ำ อันเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตกรด ผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายที่ได้จากการหมักนี้คือบิวทานอล โดยมีอะซีโตน และเอทานอล เป็นผลิตภัณฑ์รองลงมา แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของคาร์โบไฮเดรต และสภาวะการเพาะเลี้ยง ขอบเขตของการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวทำละลายนี้มีความไม่แน่นอน นอกจากนี้ คาร์บอนและอิเล็กตรอนเป็นตัวกำหนดรูปแบบของตัวทำละลายเหล่านี้ ในท้ายที่สุดของกระบวนการหมักตัวทำละลายอาจจะมีระดับความเข้มข้นจนถึงระดับของการยับยั้ง และทำให้กระบวนการผลิตสิ้นสุดลง (Bowles และ Ellefson, 1985) ตัวทำละลายที่สะสมน่าจะมีผลต่อเซลล์ของ *C. acetobutylicum* โดยการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของเซลล์ (Moreira และคณะ, 1981) และของเหลวในเซลล์ (Vollherbst-Scheneck และคณะ, 1984)

วิถีทางชีวเคมีที่หลากหลายในกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ ได้ถูกศึกษาในหลายรายงาน (Andreesen และคณะ, 1989; Ljungdahl และคณะ, 1989; Jones และ Woods, 1986; Rogers, 1986) และวิถีที่เป็นที่นิยมโดยทั่วไปได้แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.14

Kotze (1969) ได้พบว่าเอนไซม์เฮกโซฮิเนส (hexohinase, HK, EC 2.7.1.2) เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (glucose-6-phosphate phosphate isomerase, G6PI, EC 5.3.1.9) และเอนไซม์ไพรูเวตไคเนส (pyruvate kinase, PK, EC 2.7.1.40) มีกิจกรรมที่แตกต่างกันไปในกลุ่มของ clostridia (ตัวอย่างเช่น กลุ่มที่ย่อยน้ำตาลได้ (saccharolytic) กลุ่มที่ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic) กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสได้ (cellulolytic) หรือกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ (nitrogen fixing) ซึ่งทั้งหมดนี้มีความสามารถในการสลายคาร์โบไฮเดรต

จากวิถีของเชื้อ *C. acetobutylicum* ในรูปที่ 2.16 เฮกโซส 1 โมล จะให้ไพรูเวต 2 โมล ได้ ATP 2 โมล และ NADH 2 โมล กระบวนการผลิตตัวทำละลายจาก clostridia ยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโตสโดยวัฏจักรของเพนโตสฟอสเฟต (Ounine และคณะ, 1983; Cynkin และ Delwiche, 1958) ผลที่ได้ระหว่างการเติมหมู่ฟอสเฟต คือการเปลี่ยนจากเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (transaldolase) และเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส (transketolase) ให้ได้ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehydes-3-phosphate) ซึ่งจะเข้าสู่วัฏจักรไกลโคไลซิส กระบวนการสลายเพนโตส 3 โมล ไปเป็นไพรูเวต จะให้ ATP 5 โมล และ NADH 5 โมล (Rogers, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.16 วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์ และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับ จำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC ชื่อเต็มของเอนไซม์ และชื่อย่อสารเคมี จะแสดงในส่วนคำย่อและสัญลักษณ์

ที่มา: Gheshlaghi และคณะ (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไป เชื้อจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* DG1 เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว แต่สายพันธุ์ผสมจะสามารถเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนนี้ ซึ่งจะใช้เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส (glycerol kinase) และเอนไซม์กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) สำหรับการออกซิไดซ์กลีเซอรอล โดยที่กลีเซอรอล 1 โมลที่ถูกใช้ไปจะให้ ATP 1 โมลและNADH 2 โมล *C. acetobutylicum* ได้แสดงให้เห็นถึงการมียีนหลาย ๆ ตัวที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส (Nolling และคณะ, 2001) แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Mitchell, 1998) clostridia กลุ่มที่ย่อยน้ำตาลได้จะสามารถเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลกเตตได้ โดยเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) อย่างไรก็ตาม ไพรูเวตส่วนใหญ่จะใช้ไปในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตเฟอเรอออกซินดอกซิโดรีดักเทส (pyruvate-ferredoxin oxidoreductase) ไปเป็นอะเซตทิวโคเอ (acetyl-CoA) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) กับการลดลงของเฟอเรดอกซิน (ferredoxin) ไปพร้อม ๆ กัน

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum*ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต การกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และ ethyl methane sulphonate (EMS) โดยมีการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักในถังหมักขนาด 14 ลิตร โดยมี pH เริ่มต้นที่ 6.2 และไม่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดกระบวนการหมัก เติมก๊าซไฮโดรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่าการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต และการใช้สารN-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตบิวทานอลแต่การเติมสาร ethyl methane sulphonate (EMS) นั้นมีความสามารถในการเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ร้อยละ 20

Qureshi และคณะ(2008a) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาลีที่ผ่านการใส่อัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ : การผลิตบิวทานอลจากฟางต้นข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยโดยใช้ *Clostridium beijerinckii* ในถังหมักแบบกะ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในในขวดฝาเกลียวปิดขนาด 125 มิลลิลิตรทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบกันระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ จะพบว่าสามารถผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้ 21.37 และ 22.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Qureshi และคณะ (2008b) ศึกษาการผลิตบิวทานอล จากกระบวนการย่อยฟางข้าวสาลีโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ด้วยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวสาลีให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆกันได้ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100% ในการเพิ่มฟางข้าวสาลีโดยการป้อนลงในถังหมักร่วมกับสารละลายน้ำตาล ทำให้อัตราผลผลิต (productivity) ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เพิ่มขึ้น 16% เมื่อเทียบกับการการทดลองการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆ กัน ซึ่งได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.36 $gL^{-1}h^{-1}$ และ ณ เวลาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ถูกกระตุ้นสูงสุดจะได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.77 $gL^{-1}h^{-1}$ การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องใช้เวลาในทั้งสิ้น 533 ชั่วโมง

Qureshi และคณะ (2010) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดและการย่อยหญ้า switchgrass โดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลของการทดลองจะได้ว่า การทดลองควบคุมจะใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นผลลัพธ์ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลทั้งหมดเท่ากับ 21.06 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิว-ทานอล เอทานอลคือ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดโดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะไม่แสดงการเจริญเติบโต และไม่เกิดการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำและเจือจางด้วยการหมักการย่อยฟางข้าวสาลี (อัตราส่วน 1:1) ผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะมีค่าความเข้มข้นเป็น 16.00 และ 18.04 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลลัพธ์ของอัตราผลผลิต (productivity) มีค่าระหว่าง 0.17-0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการปรับสภาพด้วยการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพด ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] (เรียกว่ากระบวนการ Overliming) จุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลได้ 26.67 กรัมต่อลิตร การย่อยหญ้า switchgrass โดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะทำให้ผลของการหมักต่ำ และจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลมากกว่า 1.48 กรัมต่อลิตร หรือมากเกิน 14.61 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การปรับสภาพสารชีวมวลไม่สามารถที่จะหยุดการสร้างสารยับยั้งที่มาจากการทดลองได้ หรืออีกประการหนึ่ง เชื้อจุลินทรีย์ทนต่อสารยับยั้งและสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งอาจใช้สำหรับเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการหมักอื่นๆให้ดีขึ้น

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต การกลายพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และ ethyl methane sulphonate (EMS) โดยมีการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักในถังหมักขนาด 14 ลิตร โดยมี pH เริ่มต้นที่ 6.2 และไม่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดกระบวนการหมัก เติมก๊าซไฮโดรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่าการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต และการใช้สารN-methyl-N-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตบิวทานอลแต่การเติมสาร ethyl methane sulphonate (EMS) นั้นมีความสามารถในการเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ร้อยละ 20

Qureshi และคณะ (2008) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาลีที่ผ่านการใส่อัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้ *Clostridium beijerinckii* มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตบิวทานอลในถังหมักแบบกะ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในในขวดฝาเกลียวปิดขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบกันระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ จะพบว่าสามารถผลิต อะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้ 21.37 และ 22.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Gheshlaghi และคณะ (2009) เป็นบทความที่กล่าวถึงเมทาบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย (heterofermentative) สร้างสปอร์ได้ (Girbal และ Soucaille, 1994) การหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) แบบแบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอริซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตตและบิวทาเลต กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการ ชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1997 Fermanek และคณะ พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซีโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 กึ่งแข็ง ที่ประกอบไปด้วยมอลโตเดร็กส์ติน (maltodextrin) ร้อยละ 6 หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการผลิตบิวทานอลระหว่างสายพันธุ์ BA101กับ NCIMB 8052 พบว่าสายพันธุ์ BA101 ผลิตบิวทานอลในอัตราที่รวดเร็วกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052 และสายพันธุ์ BA101 ยังสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้อย่างสมบูรณ์มากกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052

ต่อมา ในปี ค.ศ. 2004 Tashiro และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่ควบคุมความเป็นกรดด่างให้คงที่ด้วยการเติมกรดบิวทิริค และกลูโคส จากการทดลองพบว่าการเติมกรดบิวทิริคลงไปในอาหาร สามารถเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ การผลิตอะซีโตนบิวทานอล และผลได้ของตัวทำละลายด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้โดยกระบวนการเติมกรดบิวทิริคและกลูโคส สามารถควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารให้อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระดับต่ำได้อย่างสม่ำเสมอ และได้ผลได้ของบิวทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 1.5 เท่า นอกจากนี้ยังได้อัตราผลผลิตบิวทานอลจำเพาะ (specific butanol product rate) มากกว่า 0.10 กรัมต่อกรัมต่อลิตรที่เวลา 39 ชั่วโมงของการหมัก เมื่ออัตราการส่วนระหว่างกรดบิวทิริคและกลูโคสเท่ากับ 1.6 และพบว่าการเติมกรดบิวทิริค และการควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 5.5) จะไม่พบการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเติมกรดอะซีติกลงไปในอาหารจะเพิ่มการผลิตอะซีโตนเท่านั้น

ในปี ค.ศ. 1982 Bahl และคณะรายงานว่าการเติมกรดอะซีติก และบิวทิริค ลงในการหมักแบบกึ่งกะที่ใช้ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ทำให้ผลได้ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Monot และคณะ ได้รายงานว่ากรดบิวทิริคที่ถูกเติมลงในอาหารหมัก เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตบิวทานอล โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 จากผลการทดลองยังพบว่า ความเป็นกรดด่างของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลาย ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างสูง การหมักจะได้กรดอินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่การหมักในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างต่ำจะได้ตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งการผลิตตัวทำละลายโดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 จะเพิ่มขึ้นที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ซึ่งให้ผลคล้ายการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลด้วย *Clostridium* ชนิดอื่น

ในปี ค.ศ. 1997 Formanek และคณะ พบว่าในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องใน อาหารเลี้ยงเชื้อP2กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 6 พบว่าสายพันธุ์ BA101 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ NCIMB 8052 คือ ได้ผลได้และอัตราผลผลิตของตัวทำละลายอินทรีย์เท่ากับ 0.78 และ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงสำหรับสายพันธุ์ BA101 และ 0.34 และ 1.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงสำหรับสายพันธุ์ NCIMB 8052 ที่อัตราเจือจาง 0.05 และ 0.20 ต่อชั่วโมงตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2005 Ezeji และคณะ พบว่าความเป็นไปได้ในการใช้แป้งข้าวโพดในการผลิตอะซี-โตน บิวทานอล เอทานอล โดยใช้ *C. beijerinckii* BA101 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง โดยเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และหมักแบบต่อเนื่อง *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตอะซีโตน ได้ 5.4 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้ 14.3 กรัมต่อลิตร และเอทานอลได้ 0.3 กรัมต่อลิตร

ปี ค.ศ. 2005 Tashiro และคณะศึกษาการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และการดึงเซลล์ออก จากการทดลองพบว่า การหมักอย่างต่อเนื่องที่ไม่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราการเจือจางวิกฤติ (critical dilution rate) เท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง และให้อัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทา-นอล รวมกันเท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.20 ต่อชั่วโมง สำหรับการหมักอย่างต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทานอลสูงสุดเท่ากับ 11.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.85 ต่อชั่วโมง ซึ่งการหมักในระบบนี้สามารถปรับปรุงอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรได้เมื่อหมักอย่างต่อเนื่องที่อัตราเจือจางสูง (มากกว่า 0.52 ต่อชั่วโมง) ในขณะที่การหมักอย่างต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่และการดึงเซลล์ออกจากถังหมัก มีอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และหมักได้นานถึง 200 ชั่วโมง

ปี ค.ศ. 2010 Qureshi และคณะ การย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลในการผลิต คือ ได้ อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เป็นปริมาณ 7.09 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทา-นอล เท่ากับ 0.33 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ระดับอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลนี้จะมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการควบคุมการหมัก (21.06 กรัมต่อลิตร) เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้น ในการควบคุมการหมัก ผลได้ ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเท่ากับ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเปรียบเทียบนี้จะชี้ให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางเป็นพิษต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อลดผลของความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นนี้ ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะได้รับการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] ตามด้วยการหมัก การปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะทำให้การหมักประสบผลสำเร็จ และความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้เท่ากับ 26.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้ดีกว่าการควบคุมการหมักและการหมักฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางและไม่ผ่านการปรับสภาพ (ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร) ในการหมักผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เท่ากับ 0.43 และได้อัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (390% ของการหมักที่ไม่ผ่านการปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง และการใช้ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางโดยไม่เจือจางน้ำตาล) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง ทำให้ได้อัตราผลผลิตเฉพาะ (specific productivity) เท่ากับ 0.55 ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 0.12 ต่อชั่วโมงของการควบคุมการหมักที่มีการควบคุมการกระตุ้นของคาร์บอนที่มากขึ้น ซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์การหมักโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมีการจัดเก็บใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.2 *Clostridium beijerinckii*

Clostridium beijerinckii TISTR 1390 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์และเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

เคซีน (Casein)	Cystein-HCl
โซเดียมคลอไรด์	Resazurin
กลีเซอรอล	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	ไดแอมโมเนียซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$)
แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	แคลเซียมคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($CaCl_2 . 2H_2O$)
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$)	สารสกัดจากยีสต์
แบคโตเปปโตน	สารสกัดจากเนื้อ
อีดีทีเอ (EDTA)	เฟอร์รัสซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($FeSO_4 . 7H_2O$)
แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2 . 4H_2O$)	คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 . 2H_2O$)
บอริคแอซิด (H_3BO_3)	โซเดียมโมลิปเดต-2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$)
นิกเกิลคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($NiCl_2 . 2H_2O$)	ซิงซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($ZnSO_4 . 7H_2O$)
กรดอะซิติก	กลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียมซัลเฟต	ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต
แคลเซียมคลอไรด์	แคลเซียมคาร์บอเนต
กรดไฮโดรคลอริก	โซเดียมโมลิปเดต

3.3 อุปกรณ์

ฟลาก์ส	บีกเกอร์	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
ขวดเก็บอาหาร (Duran ®)	หลอดทดลอง	หลอดทดลองฝาเกลียว
Anaerobic jar	แท่งแก้วคน	กระบอกตวง
ตะเกียงแอลกอฮอล์	เข็มเขี่ยเชื้อ	หลอดหยด
ปิเปต	จุกยางดูดสาร	จุกสำลี
จุกยางปิดฟลาก์ส	หลอดปั่นเหวี่ยง	ขวดเก็บตัวอย่าง
เครื่องเขย่า	ตู้บ่ม 30, 37 องศาเซลเซียส	เครื่องปั่นเหวี่ยง
ขวดลูกชมพู่	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	หม้อนึ่งอัดไอ
ตู้เย็น	ถังแก๊สไนโตรเจน	เครื่องชั่ง
เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex)		

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เคซีอีน เอนไซมามิค ไฮโดรไลเซต (Casein enzymatic hydrolysate)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารละลายเด็กซ์โตส (Dextrose)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม อะซีเตต (Sodium acetate)	3	กรัม
สารละลายแป้ง (Starch soluble)	1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอล-ซิสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์	0.5	กรัม
(L-Cysteine hydrochloride)		
วุ้น (Agar)	0.5	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ มาละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งอัดไอ

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูตรที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* (Andrade และ Vasconcelos, 2003) มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อหนึ่งลิตรดังนี้

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอริกซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
กรดอะซิติก (acetic acid)	2.2	กรัม
ไบโอติน (biotin)	0.04	กรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (Þ-aminobenzoic acid)	8.0	มิลลิกรัม

ทำการเติมแหล่งคาร์บอนโดยเลือกใช้กลูโคส (glucose) 50.0 กรัมต่อลิตร หรือกลีเซอรอล (glycerol) 50.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปปรับค่าพีเอช (pH) ให้ได้ 6.3 โดยเติมสารละลาย NH_4OH เข้มข้นร้อยละ 30 หรือสารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 5 โมล่าร์

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูตรที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutyricum* (Badr, Toledo และ Hamdy, 2000) หรืออาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสทีน (Glucose-yeast extract-casein-cysteine, GYCC) มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อ 1 ลิตร ดังนี้

กลูโคส (Glucose)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เคซีน (Casein)	15	กรัมต่อลิตร
Cystein-HCl	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K2HPO4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	2.5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Resazurin 0.001 กรัมต่อลิตร

ทำการเติมแหล่งคาร์บอนโดยเลือกใช้กลูโคส (Glucose) 10.0 กรัมต่อลิตรหรือกลีเซอรอล (Glycerol) 10.0 กรัมต่อลิตร

3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่นำมาเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* (Qureshi และ Blaschek, 1999) มีส่วนประกอบดังนี้

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

อะซีเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer)

KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate)	2.2	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)

กรดพารา-อะมิโน-เบนโซอิก (Para-amino-benzoic acid)	0.001	กรัม
ไทอามิน (Thiamine)	0.001	กรัม
ไบโอติน (Biotin)	0.00001	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Minerals solution)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4H_2O$	0.01	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
NaCl	0.01	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งสารสกัดยีสต์ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

จากนั้นชั่งกลูโคส 20 หรือ 60 กรัม หรือกลีเซอรอล 20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำส่วนผสมทั้งห้าสารละลายมารวมกันให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร จึงนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ในการทดลอง

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobytylicum*

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutyricum* ดังมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 แลละ 3.4.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้ว ทำการเขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากอาหารแข็ง reinforced clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมไนโตรเจน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

นำเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในหลอดอาหาร Reinforced Clostridial และเก็บรักษาโดยแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลอดละ 6 มิลลิลิตรจำนวน 12 หลอด โดยทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเชื้อจุ่มในน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที (Wilfrid และคณะ, 1991) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Reinforced Clostridial ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 60 มิลลิลิตร ต่อมา ทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในฟลาก์สเพื่อไล่ออกซิเจนเป็นเวลา 2 นาที ปิดปากฟลาก์สด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากความขุ่นและฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใส่กลีเซอรอลเป็น 10 20 30 และ40 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าให้ได้พีเอชประมาณ 6.3 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดหัวเชื้อที่เตรียมในหัวข้อ 3.5.1 มา 5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ต่อด้วยการเติมก๊าซไนโตรเจน แล้วนำไปเลี้ยงที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 24 48 72 96 120 144 และ168 ชั่วโมง โดยจะนำมาทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 และ 660 นาโนเมตรซึ่งวัดได้จากเครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์ และค่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) จากนั้น นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสารเคมีในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในระดับฟลาสก์

ในการทดลองจะทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 45 มิลลิลิตรในสภาวะนิ่ง โดยทำการลงเชื้อจาก Pre-culture ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมงโดยในแต่ละชั่วโมงจะเก็บตัวอย่างมาชั่วโมงละ 3 ฟลาสก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

3.6.3 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในถังหมักที่ไม่ใช้ใบพัด

เตรียมอาหาร GYCC 2 สูตร คือสูตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งไนโตรเจนและสูตรที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำมาถังหมักที่มีอาหารอยู่ภายในที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาต่อเข้ากับปั๊ม เครื่องทำความเย็น (cooling) ตั้งอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อทำให้อาหารมีสภาวะ ไร้อากาศ หลังจากนั้นทำการลงเชื้อจาก Pre – culture ที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 3.5.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.4 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ใบพัด

ทำการเตรียมการอาหารและ Pre-culture รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการหมักให้เหมือนกับหัวข้อ 3.6.2 แต่เพิ่มสภาวะการกวนเข้าไป โดยทำการกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทความเข้มข้น 20 และ60 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอล เป็นสับสเตรทเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายวิตามินและสารละลายเกลือแร่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตรเรียบร้อยแล้ว แบ่งใส่ฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 24 ฟลาก์สๆ ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ ลงในแต่ละฟลาก์สๆ ละ 5 มิลลิลิตร ต่อมาทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในฟลาก์สเพื่อไล่ออกซิเจน ปิดปากฟลาก์สด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์

ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มด้วยการเจือจางเป็นชุด (series dilution) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวน โดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) เริ่มจากหลอมอาหารเพาะเชื้อให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมตัวอย่างอาหารให้เจือจางได้ความเข้มข้นช่วงที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 จาน โดยเรียงจานทั้ง 3 ซ้อนกัน ดูดอาหารใส่จานล่างสุดก่อน แล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุด เช่นเดียวกัน เขย่าจานที่ซ้อนอยู่ทั้ง 3 ใบพร้อมกันโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วันโดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bergmeyer และ Grassel, 1983)

นำส่วนใสของตัวอย่างช่วงเวลาละ 3 ซ้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้ ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม DNS 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำก๊อกและเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยใช้แบลงค์ (blank) เป็นน้ำกลั่นแทนน้ำตาลกลูโคส จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมสารละลายมาตรมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงในรูปที่ ก.2 และ ก.3 ภาคผนวก ก

3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสม ด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็น internal standard จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion ขนาด particle size 9 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมล่าร์ ที่มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง ใช้ run time 40 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อนำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/ml) และสารที่ได้จาการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

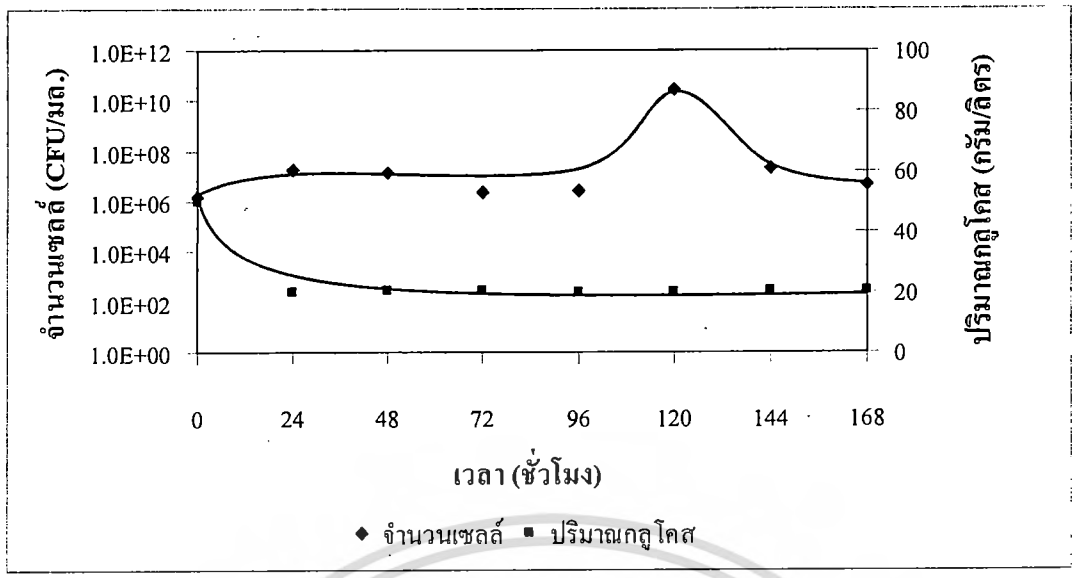
4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1

4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

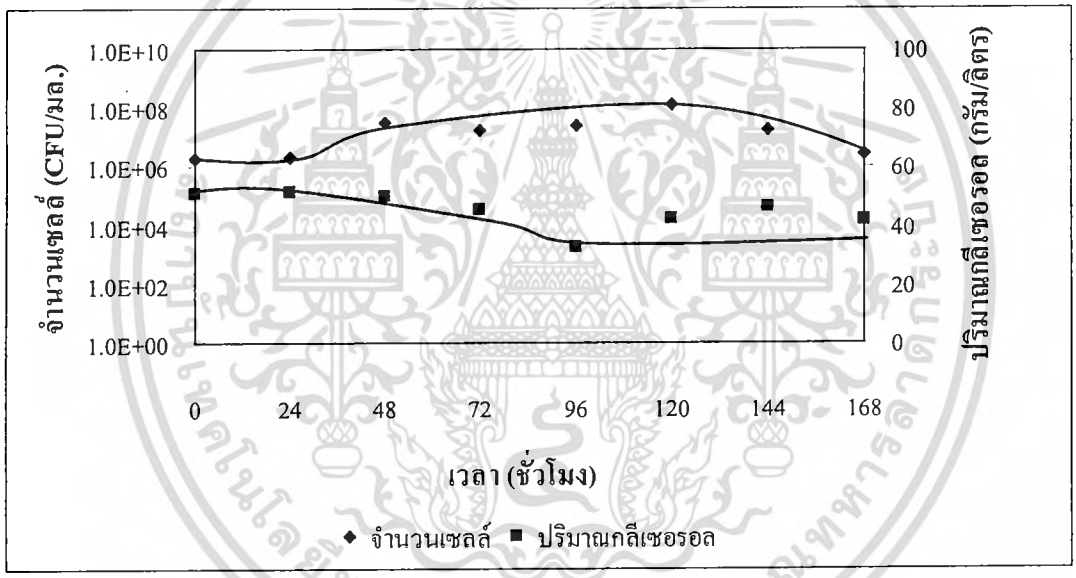
ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงเดียวของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ เริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารแข็ง reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน anaerobic jar ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้อากาศ และนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 168 ชั่วโมง

จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน(pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-6} และ10^{-8} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสและกลีเซอรอลโดยเครื่อง HPLC ได้ผลการทดลองตามรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณแหล่งอาหารที่เหลืออยู่ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ก) ในอาหารชุดควบคุมที่มีกลูโคสและ (ข) ในอาหารที่มีกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลของการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU/mL)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.43 \pm 0.24 \times 10^{6})^{b}$	50.0
24	$(1.80 \pm 0.20 \times 10^{7})^{b}$	20.1
48	$(1.33 \pm 0.31 \times 10^{7})^{b}$	20.4
72	$(2.33 \pm 1.53 \times 10^{6})^{b}$	20.5
96	$(2.67 \pm 1.53 \times 10^{6})^{b}$	20.0
120	$(2.67 \pm 1.53 \times 10^{10})^{a}$	19.9
144	$(2.13 \pm 0.85 \times 10^{7})^{b}$	20.5
168	$(4.33 \pm 2.08 \times 10^{6})^{b}$	20.6

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากรูปที่ 4.1 (ก) และตารางที่ 4.1 พบว่าในกระบวนการหมักโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในชุดควบคุมซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลูโคส เมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นจำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร และมีการใช้ปริมาณกลูโคสไปประมาณ 30 กรัมต่อลิตร จากนั้น ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มีค่าลดลงตามเวลาที่ผ่านไป โดยที่ 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีจำนวนเซลล์เหลือ 2.13×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และที่ 168 ชั่วโมง มีเชื้อจุลินทรีย์รอดอยู่เพียง 4.33×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.97 \pm 0.28 \times 10^{6})^{c}$	51.0
24	$(2.20 \pm 0.13 \times 10^{6})^{c}$	51.5
48	$(3.23 \pm 0.23 \times 10^{7})^{b}$	50.0
72	$(1.67 \pm 0.06 \times 10^{7})^{bc}$	45.5
96	$(2.47 \pm 0.23 \times 10^{7})^{b}$	32.5
120	$(1.33 \pm 0.29 \times 10^{8})^{a}$	42.5
144	$(1.70 \pm 0.46 \times 10^{7})^{bc}$	46.5
168	$(2.66 \pm 1.20 \times 10^{6})^{c}$	42.0

หมายเหตุ a, b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในขณะที่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (รูปที่ 4.1 ข และตารางที่ 4.2) เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป จำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มี 1.33×10^{8} CFU/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากกลูโคสแล้ว (2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร) มีค่าน้อยกว่าถึง 200 เท่า อันน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้ จากรายงานของ Durre (2008) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี จากนั้นจำนวนเซลล์ก็ จะมีปริมาณลดลงตามเวลาที่ผ่านไป โดยที่ 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบเชื้อจุลินทรีย์ 1.70×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และนับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ได้ 2.66×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ 168 ชั่วโมง ส่วนปริมาณกลีเซอรอลก็จะแปรผันตามจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1462 ใช้กลีเซอรอลไปเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 18.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลนั้นจะมีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ไปในทางเดียวกับชุดควบคุมซึ่งมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยนำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อเป็น internal standard จากนั้น นำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก เมทานอล และกรดบิวทิวเรต ด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบบิวทานอล อะซิโตน หรือเอทานอลซึ่งเป็น 3 สารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรพบตามเมทาบอริซึม (Durre, 2008) ทั้งจากสองสารอาหารตั้งต้น

อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าสารที่เกิดขึ้น คือ เมทานอล (ความเข้มข้นแสดงดังในตารางที่ 4.3 และโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เทียบกับโครมาโตแกรมของบิวทานอลมาตรฐานแสดงในรูป ก.5 ภาคผนวก ก) เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีรายงานของ Maintinguer และคณะ (2008) ว่าเมทานอลเป็นสารตัวกลางในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากบ่อบำบัดน้ำเสียซึ่งมี *Clostridium acetobutyricum* อยู่ด้วย แสดงว่างานวิจัยนี้อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจน และเกิดเมทานอลเป็นสารตัวกลางในเมทาบอริซึม สังเกตจากตารางที่ 4.3 พบว่าความเข้มข้นของเมทานอลมีค่าลดลงตามเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ผ่านไป

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Schink และ Zeikus (1980) ว่าเชื้อ *Clostridium* สามารถผลิตเมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อใช้เพคตินเป็นสารอาหารตั้งต้น แต่ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการผลิตเมทานอลได้ ซึ่งก็สอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ ซึ่งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร จะพบซอร์บิทอลอยู่ในส่วนใส โดยที่ไม่พบสารนี้เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของซอร์บิทอลนี้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงคือ 0.53 กรัมต่อลิตร ซึ่งน่าจะเป็นน้ำตาลที่ปนเปื้อนมาในกลูโคสที่ใช้เป็นสารอาหาร เพราะมีค่าความเข้มข้นคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้ สอดคล้องกับรายงานของ Mitchell (1996) ที่ทำการทดลองหาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* (เปลี่ยนชื่อจาก *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเมทานอลที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเมทานอล (กรัมต่อลิตร)
0	17.30
24	14.63
48	11.97
72	9.00
96	7.97
120	6.75
144	4.00
168	7.78

4.1.2 การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อหาการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่เหมาะสมเพื่อนำมาอ้างอิงเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหาปริมาณของกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นการทดลองต่อไป โดยเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร

โดยพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 120 จะพบว่ามีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นจำนวนดังต่อไปนี้ 5.73×10^5, 1.97×10^8, 1.64×10^8, 5.33×10^8 และ 1.33×10^8CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่ามีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากที่สุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เป็น 5.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง

ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตชั่วโมงที่ 120 (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
10	$(5.73\pm0.22 \times 10^{5})^{b}$	nd
20	$(1.97\pm0.16 \times 10^{8})^{b}$	nd
30	$(1.64 \pm0.31 \times 10^{8})^{b}$	17.00
40	$(5.33\pm0.25 \times 10^{8})^{a}$	39.50
50	$(1.33 \pm0.29 \times 10^{8})^{b}$	42.50

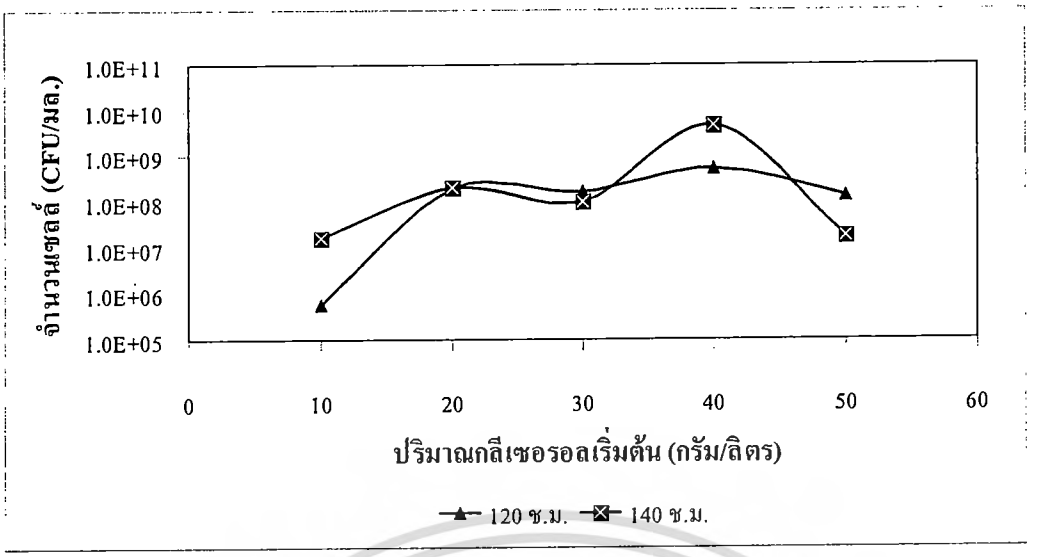
หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง

ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ชั่วโมงที่ 144 (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
10	$(1.63 \pm0.40 \times 10^{7})^{b}$	nd
20	$(2.01\pm0.86 \times 10^{8})^{b}$	nd
30	$(1.00\pm0.20 \times 10^{8})^{b}$	17.00
40	$(4.80 \pm0.85 \times 10^{9})^{a}$	36.00
50	$(1.70\pm0.46 \times 10^{7})^{b}$	46.50

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* สูงสุด ที่ 120 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอ-รอลเริ่มต้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และที่ 144 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะพบว่ามีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นจำนวนดังต่อไปนี้ 1.63×10^7, 2.01×10^8, 1.00×10^8, 4.80×10^9 และ 1.70×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตที่ 120 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 4.80×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.2

เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตรและ 30 กรัมต่อลิตร จะมีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงคือ 1.63×10^7, 2.01×10^8 และ 4.80×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร จะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือ 1.64×10^8 และ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำผลจำนวนเซลล์ที่ได้จากการหมักมาเปรียบเทียบกันทางสถิติจะพบว่าการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 4.80×10^9 CFU ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ในขณะเดียวกันนั้นจะพบว่าปริมาณกลีเซอรอลนั้นจะมีค่าลดลงมากที่สุดในการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไปในการเจริญเติบโตประมาณ 13 กรัมต่อลิตร

4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2

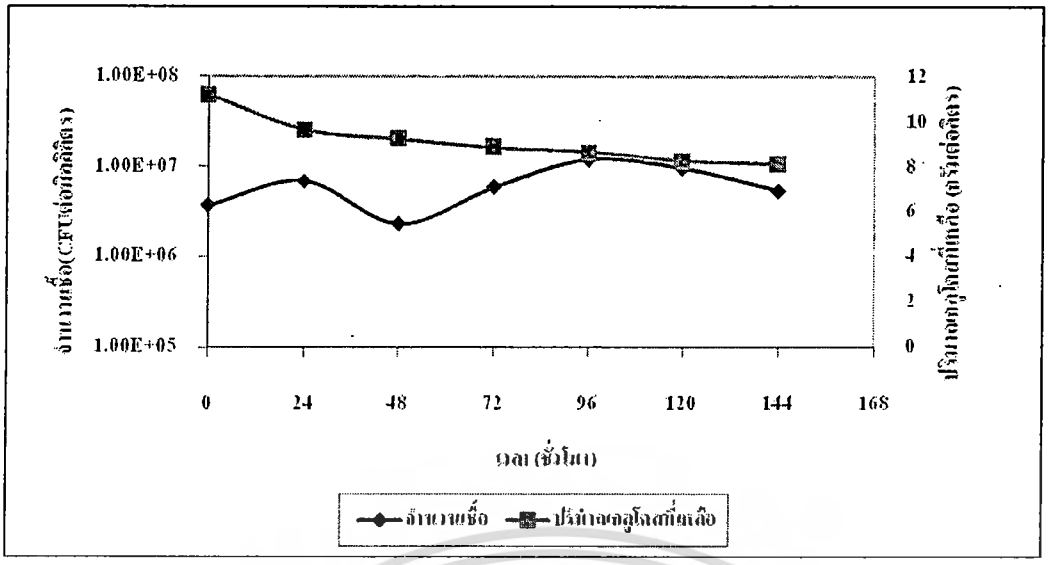
4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยเริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารเหลว Reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยบ่มไร้อากาศ (Aaerobic jar) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลว GYCC ปริมาตร 45 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้อากาศ นำไปเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 144 ชั่วโมง

จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยเทคนิคการ Pour plate ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFUต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ของ Miller ส่วนใสที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิตริก และกรดบิวทิวเรตด้วยเครื่อง HPLC

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุด เมื่อการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 96 ชั่วโมง ได้ 1.20×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันมากเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีค่าสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▣ ปริมาณกลูโคส)

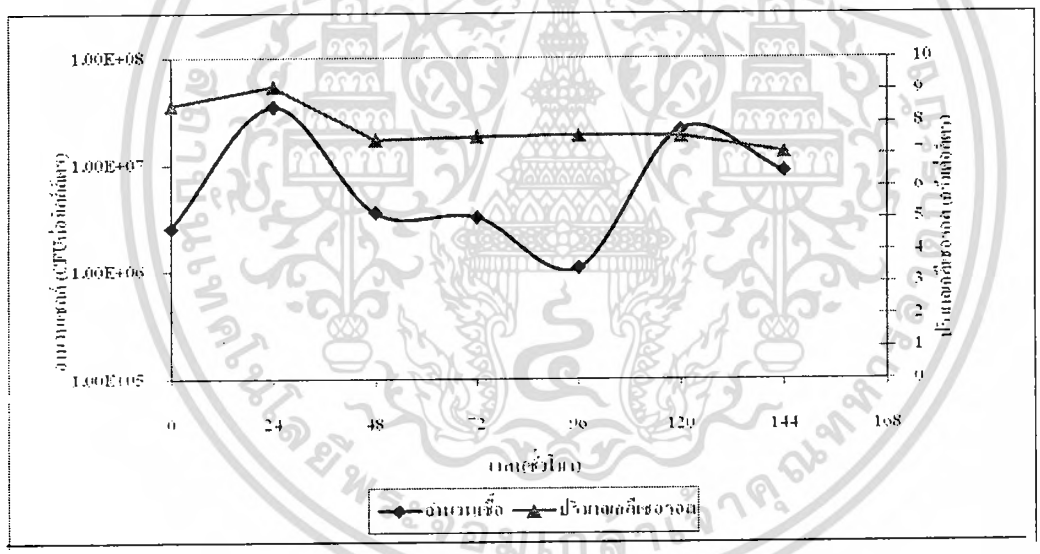
ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(3.70 \pm 1.21 \times 10^{6})^{b}$	11.15
24	$(6.88 \pm 3.34 \times 10^{6})^{b}$	9.63
48	$(2.32 \pm 0.20 \times 10^{6})^{b}$	9.23
72	$(5.93 \pm 5.96 \times 10^{6})^{b}$	8.85
96	$(1.20 \pm 1.66 \times 10^{7})^{b}$	8.63
120	$(9.57 \pm 4.86 \times 10^{6})^{b}$	8.25
144	$(5.33 \pm 5.33 \times 10^{7})^{a}$	8.10

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี จากชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 3.70 $\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 6.88 $\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ต่อมาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตจะลดลงเล็กน้อยเป็น 2.32 $\times 10^5$ CFUต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 96 มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ 1.20 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร และลดลงจนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.33$\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อจบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 144 ชั่วโมง ส่วนการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่าใช้ปริมาณน้ำตาลไปประมาณ 1.52 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 11.15 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 9.63 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อที่มีชีวิตของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีแนวโน้มสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 144) มีปริมาณลดลงไม่มากนักจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ส่วนผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC (ไม่ได้นำมาแสดง) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆทั้งอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล



รูปที่ 4.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.57 \pm 2.20 \times 10^{6})^{b}$	$(8.52 \pm 0.08)^{a}$
24	$(3.47 \pm 1.60 \times 10^{7})^{a}$	$(9.12 \pm 0.55)^{a}$
48	$(3.56 \pm 3.38 \times 10^{6})^{b}$	$(7.45 \pm 0.02)^{b}$
72	$(3.23 \pm 1.50 \times 10^{6})^{b}$	$(7.55 \pm 0.03)^{b}$
96	$(1.10 \pm 1.57 \times 10^{6})^{b}$	$(7.60 \pm 0.09)^{b}$
120	$(2.16 \pm 3.35 \times 10^{7})^{ab}$	$(7.57 \pm 0.92)^{b}$
144	$(8.73 \pm 3.78 \times 10^{6})^{ab}$	$(7.07 \pm 0.76)^{b}$

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.7 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดนับได้ 3.47×10^{7} CFUต่อมิลลิลิตร แต่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 120 และ 144 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.16×10^{7} และ 8.73×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยดังจะเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งมีค่าสูงเหมือนกรณีการใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยง นั่นคือเชื้อ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ส่วนการใช้กลีเซอรอลของเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตจะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถใช้กลีเซอรอลได้ โดยกลีเซอรอลลดลงทั้งหมด 2.05 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ปริมาณกลีเซอรอลมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจากการใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ปริมาณกลีเซอรอลในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมงมีค่าลดลงไม่มากจากปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น ส่วนผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC (ไม่ได้นำมาแสดง) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆ ทั้งอะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

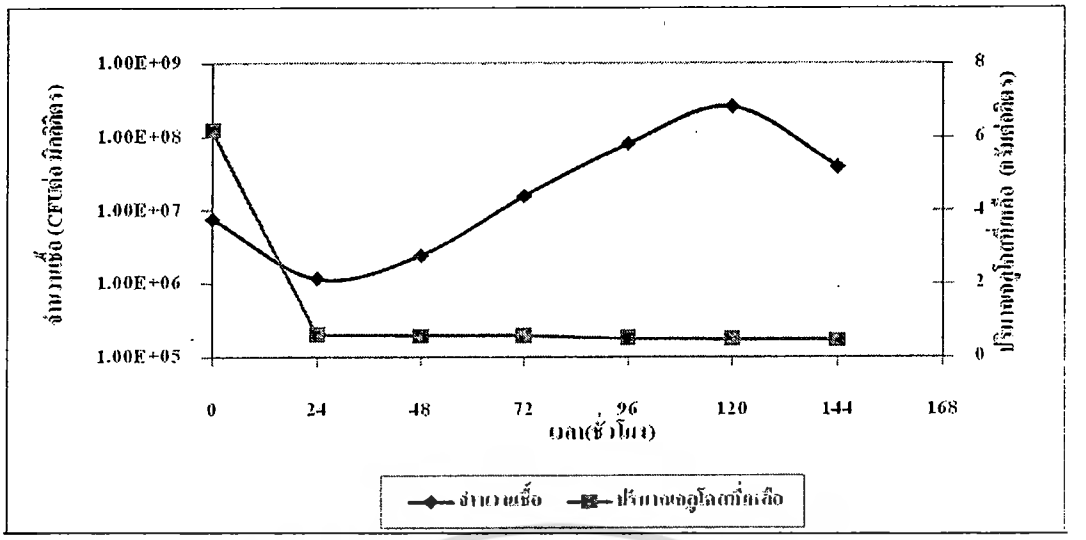
จากรายงานของ รติกร รัตน์ติณา และ ชุติมา (2552) ศึกษาการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสโดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มาทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเท่ากับ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้เท่ากับ 4.80×10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากันของเชื้อทั้ง 3 ฟลาสก์ จึงได้มีการทดลองในระดับถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไร้ออกซิเจนแน่นอน โดยในขั้นแรกจะทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสกับที่ใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว และในขั้นตอนต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดซึ่งมีอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัด

จากรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัดโดยมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่ 24 มีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.16×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดการปรับตัวภายในถังหมัก และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.60×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากชั่วโมงอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.18 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดนั้นปริมาณกลูโคสเหลือเพียง 0.48 กรัมต่อลิตร เท่ากับมีการใช้น้ำตาลไป 5.7 กรัมต่อลิตร กล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณน้ำตาลกลูโคสแปรผันกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

ตารางที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(7.57 \pm 0.27 \times 10^{6})^{c}$	6.18	6.00
24	$(1.16 \pm 0.38 \times 10^{6})^{c}$	0.59	5.09
48	$(2.43 \pm 0.57 \times 10^{6})^{c}$	0.58	5.26
72	$(1.59 \pm 0.97 \times 10^{7})^{bc}$	0.57	5.31
96	$(8.03 \pm 5.44 \times 10^{7})^{b}$	0.50	5.35
120	$(2.60 \pm 0.57 \times 10^{8})^{a}$	0.48	5.38
144	$(3.93 \pm 0.40 \times 10^{7})^{bc}$	0.47	5.41

หมายเหตุ a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

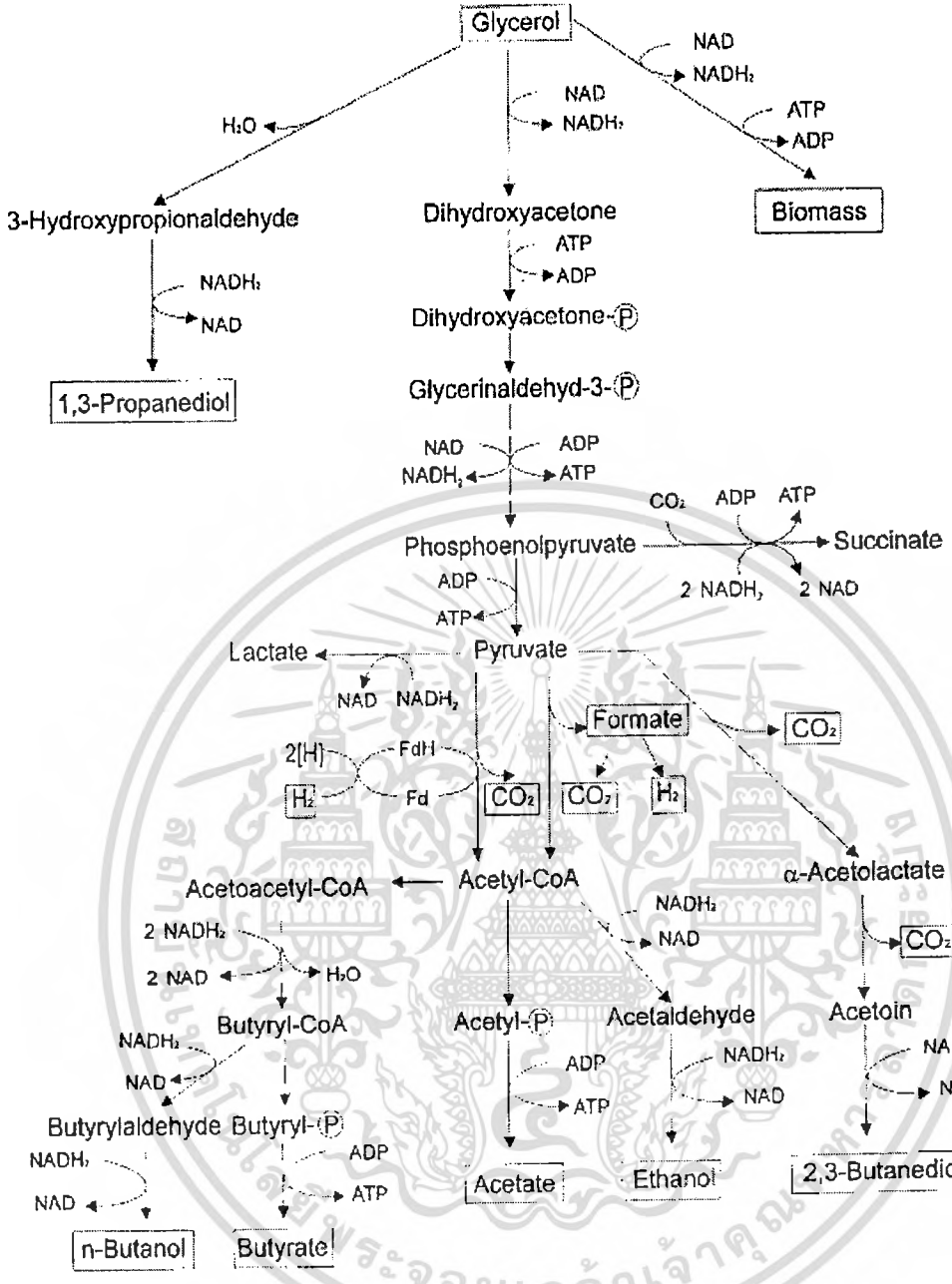
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ อังคณา มุขพลอย (2549) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลจากสารสกัดฟางข้าวโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 ศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่ดีที่สุดประกอบด้วย กลูโคสที่มีอยู่ในน้ำคั้นฟางข้าว 70.27 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.56 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก พี เอช (pH) เริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะในสภาวะไร้อากาศที่ทำให้เชื้อ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด (2.64 กรัมต่อลิตร) คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช (pH) เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคส มีการผลิตเอทานอล 0.180 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นหนึ่งในสามผลิตภัณฑ์หลักที่ประกอบไปด้วยอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและ1,3-โพรเพนไดออล 0.031 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้จากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัดนั้น พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตลดลงเหมือนกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 4.43 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 0 ไปเป็น 1.16 $\times 10^5$ CFUต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์กลับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.24 $\times 10^8$ CFUต่อมิลลิลิตร การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการสังเกตที่ค่าพี-เอช (pH) พบว่า ค่าพีเอช (pH) ที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.67 และเพิ่มขึ้นเป็น 6.98 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 พีเอช (pH) มีค่าลดลง แสดงว่ามีการสร้างกรดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

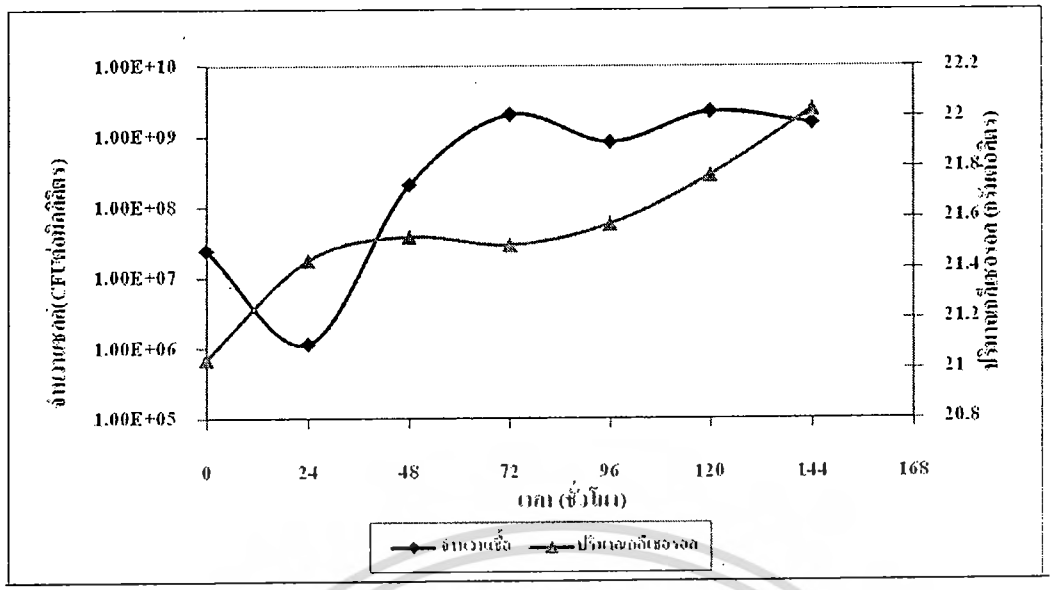
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม

ที่มา : Biebl และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

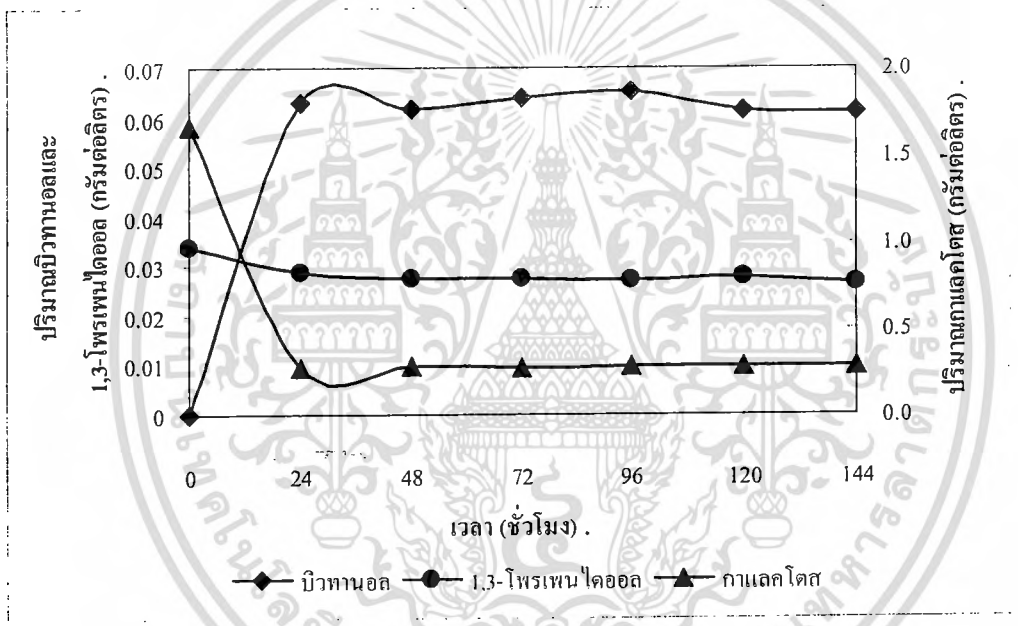
ตารางที่ 4.9 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(2.43 \pm 0.42 \times 10^{7})^{d}$	$(21.07 \pm 0.13)^{d}$	6.76
24	$(1.16 \pm 0.38 \times 10^{6})^{d}$	$(21.43 \pm 0.21)^{c}$	6.98
48	$(2.08 \pm 0.45 \times 10^{8})^{d}$	$(21.52 \pm 0.16)^{c}$	6.11
72	$(2.03 \pm 0.70 \times 10^{9})^{ab}$	$(21.49 \pm 0.11)^{c}$	5.98
96	$(8.27 \pm 0.38 \times 10^{8})^{c}$	$(21.57 \pm 0.13)^{bc}$	6.04
120	$(2.24 \pm 0.17 \times 10^{9})^{a}$	$(21.77 \pm 0.11)^{b}$	6.05
144	$(1.54 \pm 0.21 \times 10^{9})^{b}$	$(22.03 \pm 0.01)^{a}$	6.06

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์จากรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.10 จะพบบิวทานอลเฉลี่ยประมาณ 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 144 นอกจากนี้ยังพบ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยประมาณ 0.029 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และยังพบกาแลคโตสซึ่งมีปริมาณลดลงจาก 1.662 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเหลือเป็นประมาณ 0.275 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงและมีปริมาณคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเจริญเติบโตและการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้ออาจมาจากกาแลค-โตสในเคซีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร GYCC



รูปที่ 4.8 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.034 ±0.000[a]	1.662 ±0.043[a]
24	0.063 ±0.006[a]	0.029 ±0.001[b]	0.275 ±0.003[b]
48	0.062 ±0.004[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
72	0.064 ±0.002[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
96	0.065 ±0.002[a]	0.027 ±0.001[d]	0.277 ±0.002[b]
120	0.061 ±0.002[a]	0.028 ±0.000[c]	0.279 ±0.001[b]
144	0.061 ±0.001[a]	0.027 ±0.001[d]	0.282 ±0.001[b]

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ใบพัด

จากตารางที่ 4.11 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงแรกของการเจริญจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญลดลงจาก 3.66×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 2.16×10^{5} CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.68 เป็น 4.87 ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคู่ไปกับปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน จนมีค่าความเข้มข้นเหลือเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร แต่ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อไม่สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^{7} CFUต่อมิลลิลิตร ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.84 และในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.71×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีน้อย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชั่วโมงที่ 96 และ 120 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนถึงชั่วโมงที่ 144 เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

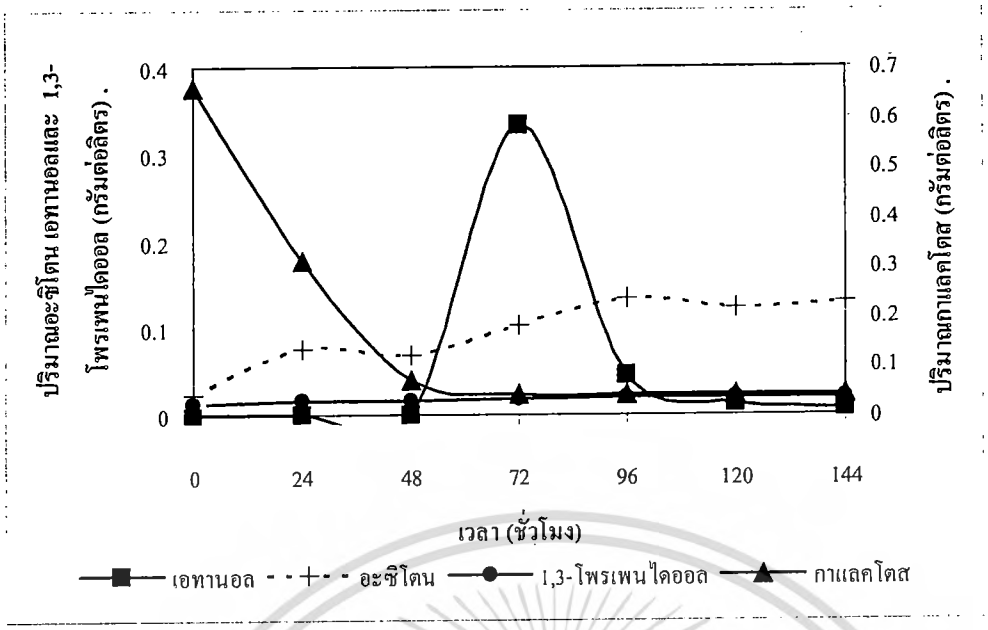
ตารางที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(3.66\pm5.80\times10^{6})^{b}$	6.267	6.68
24	$(2.16\pm0.67\times10^{6})^{b}$	1.500	4.87
48	$(1.26\pm1.32\times10^{7})^{b}$	0.702	4.82
72	$(2.19\pm0.56\times10^{7})^{ab}$	0.677	4.83
96	$(5.73\pm5.34\times10^{7})^{a}$	0.674	4.84
120	$(1.71\pm0.94\times10^{7})^{ab}$	0.670	4.84
144	$(2.85\pm4.59\times10^{7})^{ab}$	0.668	4.85

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

รายงานการศึกษาของ ลักขณา เหล่าไพบูลย์ (2549) ศึกษาการเจริญของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในการเลี้ยงแบบกะในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแบบปั่นเหวี่ยงและไม่ปั่นเหวี่ยง พิจารณาค่าความเข้มข้นเซลล์เป็น CFU ต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Pour plate technique พบว่าให้ผลการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแบบไม่ปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะพีเอช (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอะซิโตน-บิทานอล-เอทานอล พีเอช (pH) 6.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

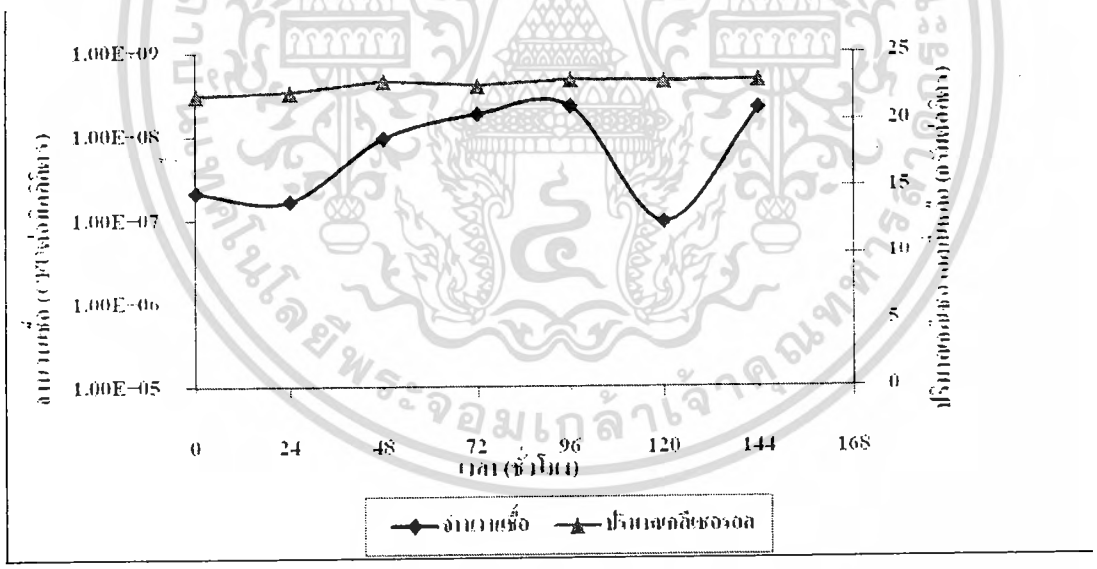
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.024 ±0.003 ^{c}	0.013 ±0.001 ^{b}	0.661 ±0.001 ^{a}
24	0	0.076 ±0.047 ^{b}	0.017 ±0.004 ^{a}	0.314 ±0.030 ^{b}
48	0	0.069 ±0.039 ^{b}	0.017 ±0.003 ^{a}	0.074 ±0.070 ^{c}
72	0.333±0.018 ^{a}	0.104 ±0.004 ^{ab}	0.019 ±0.000 ^{a}	0.039 ±0.001 ^{c}
96	0.045 ±0.002 ^{b}	0.134 ±0.011 ^{a}	0.020 ±0.001 ^{a}	0.039 ±0.001 ^{c}
120	0.012 ±0.001 ^{c}	0.123 ±0.002 ^{a}	0.020 ±0.000 ^{a}	0.039 ±0.000 ^{c}
144	0.007 ±0.010 ^{c}	0.130 ±0.009 ^{a}	0.020 ±0.001 ^{a}	0.038 ±0.002 ^{c}

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC ตามรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.12 ไม่พบบิวทานอล แต่พบเอทานอลเข้มข้นประมาณ 0.333 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 72 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลกาแลคโตสที่ลดลงจาก 0.661 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นเหลือ 0.039 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 72 เช่นเดียวกัน และพบอะซิโตนเข้มข้นสูงสุด 0.134 กรัมต่อลิตรที่ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลเฉลี่ยเท่ากับ 0.018 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

จากรายงานของ อังคณา มุขพลอย (2549) ศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่ดีที่สุดประกอบด้วยกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำคั้นฟางข้าว 70.27 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก พีเอช (pH) เริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะในสภาวะไร้อากาศที่ทำให้เชื้อ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด (2.64 กรัมต่อลิตร) คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

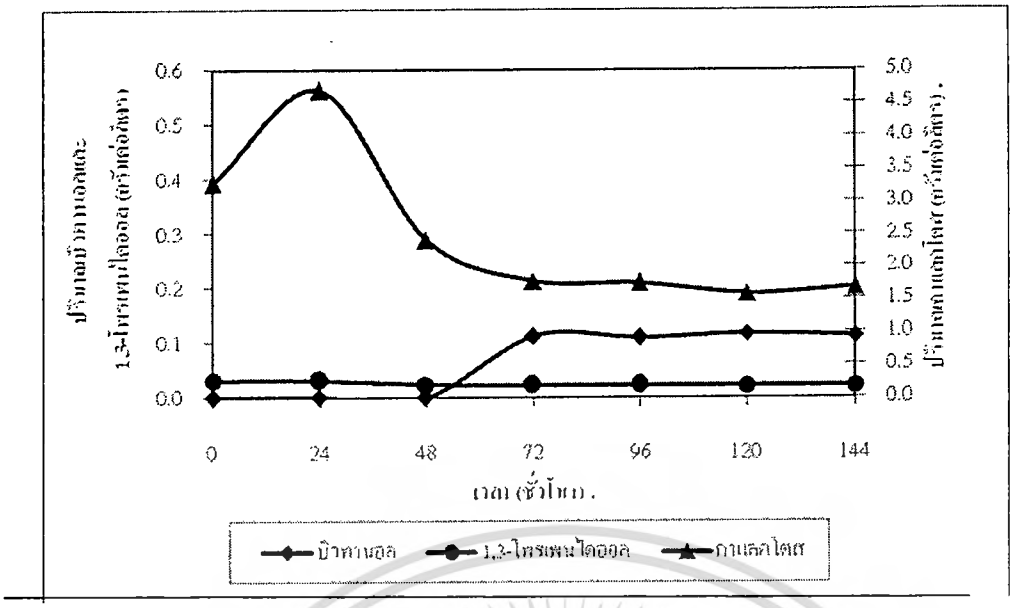
ตารางที่ 4.13 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(2.11\pm0.38\times10^{7})^{c}$	$(21.83\pm0.05)^{d}$	6.68
24	$(1.65\pm0.29\times10^{7})^{c}$	$(22.05\pm0.05)^{c}$	6.44
48	$(9.38\pm8.66\times10^{7})^{bc}$	$(22.88\pm0.17)^{a}$	6.98
72	$(1.83\pm0.95\times10^{8})^{ab}$	$(22.54\pm0.11)^{b}$	6.98
96	$(2.30\pm0.40\times10^{8})^{a}$	$(22.97\pm0.08)^{a}$	6.90
120	$(9.55\pm9.12\times10^{6})^{c}$	$(22.90\pm0.01)^{a}$	6.90
144	$(2.17\pm0.31\times10^{8})^{a}$	$(22.99\pm0.09)^{a}$	6.98

หมายเหตุ a, b,c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารสูตร GYCC พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 2.25×10^{8} CFUต่อมิลลิลิตร และเชื้อมีจำนวนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.13 ส่วนค่าพีเอช (pH) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.032 ±0.001 [a]	3.272 ±2.83 [ab]
24	0	0.031 ±0.001 [a]	4.693 ±0.25 [a]
48	0.027 ±0.047 [b]	0.023 ±0.001 [b]	2.407 ±0.30 [b]
72	0.112 ±0.001 [a]	0.022 ±0.000 [c]	1.780 ±0.14 [b]
96	0.1093 ±0.002 [a]	0.022 ±0.001 [c]	1.753 ±0.06 [b]
120	0.1173 ±0.010 [a]	0.021 ±0.001 [a]	1.590 ±0.20 [b]
144	0.1127 ±0.002 [a]	0.022 ±0.001 [a]	1.679 ±0.03 [b]

หมายเหตุ a, b,c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TI STR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC เริ่มพบบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงเข้มข้น 0.027 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นเป็น 0.112 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบเอทานอล และอะซิโตน ซึ่งจำนวนเชื้อที่มีชีวิตและปริมาณบิวทานอลมีแนวโน้มสอดคล้องไปกับการใช้น้ำตาลกาแลคโตส ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3.272 กรัมต่อลิตรลดลงเป็น 1.753 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

4.3.1 *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P 2 ซึ่งเป็นอาหารชุดควบคุมของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 โดยเริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารแข็ง reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน anaerobic jar ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเชื้อจุ่มในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที นำไปถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้ออกซิเจน และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และเก็บตัวอย่างต่อไปทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 168 ชั่วโมง

จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.12 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 เริ่มต้นนับได้ 1.96×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 8.38×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น เมื่อเวลาผ่านไปจนจบการเพาะเลี้ยงที่ 168 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงเรื่อยๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท (น้ำตาลกลูโคส) โดยค่าความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 37.09 กรัมต่อลิตร คำนวณเป็นค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ไป 23.69 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144และ168 ชั่วโมง มีการใช้น้ำตาลเพียงเล็กน้อยและเหลือความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ 20.30 กรัมต่อลิตร

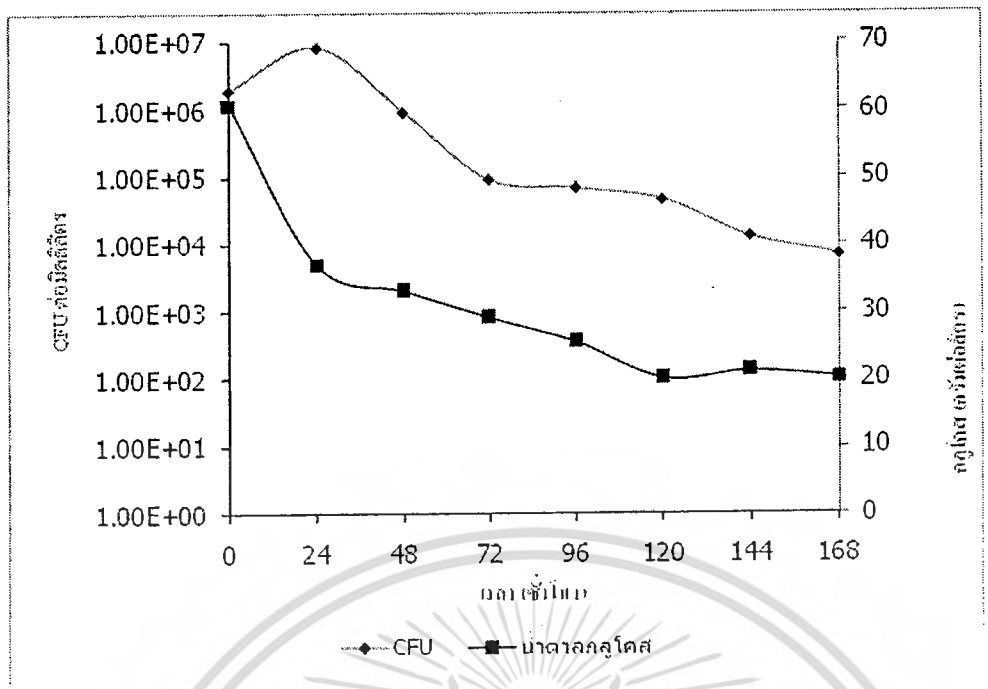
ตารางที่ 4.15 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.96 \pm 0.06 \times 10^6)^b$	60.75 ± 0.56^a
24	$(8.38 \pm 0.21 \times 10^6)^a$	37.09 ± 1.26^b
48	$(9.26 \pm 0.21 \times 10^5)^c$	33.16 ± 0.94^c
72	$(9.10 \pm 0.07 \times 10^4)^d$	29.18 ± 0.37^d
96	$(6.90 \pm 0.20 \times 10^4)^d$	25.60 ± 1.12^e
120	$(4.58 \pm 0.07 \times 10^4)^d$	20.68 ± 1.72^f
144	$(1.31 \pm 0.09 \times 10^4)^d$	21.25 ± 0.84^f
168	$(7.10 \pm 0.95 \times 10^3)^d$	20.31 ± 1.13^f

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (—◆—) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (—■—) ในอาหารอุดม P2

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.13 ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 120 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 168 และมีการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลตลอดการเพาะเลี้ยง เนื่องมาจากสารนี้พบได้ในเมตาบอริซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.21 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

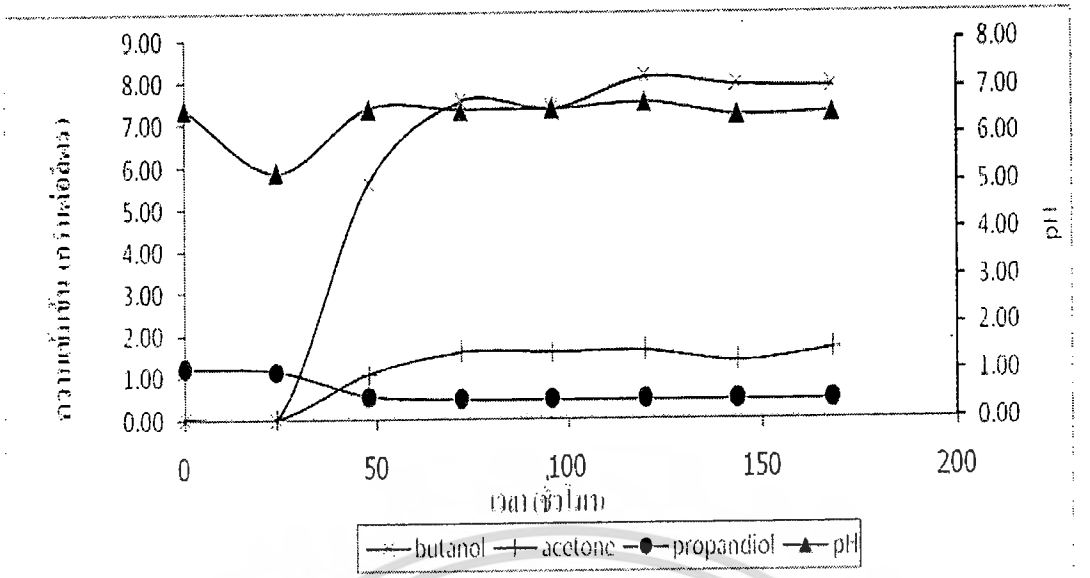
ตารางที่ 4.16 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.56	0^{c}	0^{d}	1.21 ± 0.08^{a}
24	5.22	0^{c}	0^{d}	1.14 ± 0.06^{a}
48	6.57	5.61 ± 0.55^{b}	1.07 ± 0.23^{c}	0.55 ± 0.02^{b}
72	6.53	7.55 ± 0.40^{a}	1.59 ± 0.16^{ab}	0.46 ± 0.02^{c}
96	6.56	7.38 ± 0.22^{a}	1.58 ± 0.04^{ab}	0.45 ± 0.01^{c}
120	6.69	8.12 ± 0.65^{a}	1.63 ± 0.09^{a}	0.45 ± 0.01^{c}
144	6.42	7.94 ± 0.63^{a}	1.37 ± 0.13^{b}	0.45 ± 0.01^{c}
168	6.47	7.90 ± 0.32^{a}	1.65 ± 0.15^{a}	0.45 ± 0.02^{c}

หมายเหตุ a, b, c และ d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—×—) อะซีโตน (—+—) 1,3 โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส

เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 ของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบดำเนิน วิธีการทดลองแบบเดียวเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

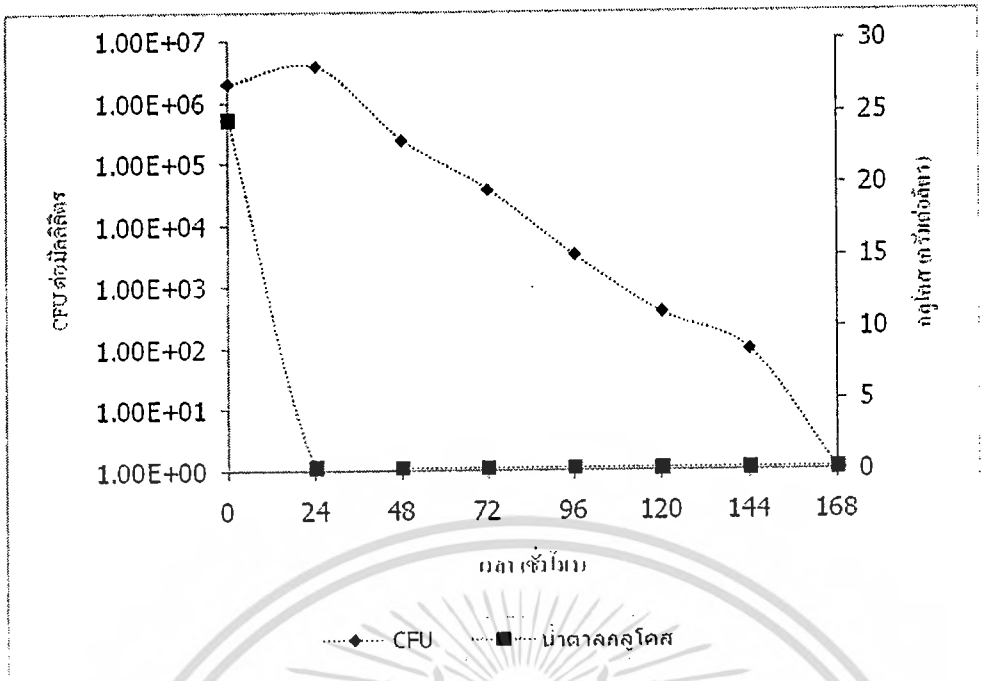
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.07 \pm 0.09 \times 10^{6})^{b}$	24.55 ± 1.21^{a}
24	$(3.93 \pm 0.37 \times 10^{6})^{a}$	0.27 ± 0.02^{b}
48	$(2.45 \pm 0.21 \times 10^{5})^{c}$	0.25 ± 0.00^{b}
72	$(3.82 \pm 0.40 \times 10^{4})^{c}$	0.23 ± 0.00^{b}
96	$(3.31 \pm 0.19 \times 10^{3})^{c}$	0.22 ± 0.00^{b}
120	$(3.90 \pm 0.70 \times 10^{2})^{c}$	0.19 ± 0.00^{b}
144	$(9.33 \pm 2.52 \times 10)^{c}$	0.20 ± 0.00^{b}
168	0^{c}	0.20 ± 0.00^{b}

หมายเหตุ a, b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.14 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.07×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 3.93×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ต่อมาพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงอย่างรวดเร็วจนจบการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท หรือน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีการลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 0.27 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณตามตารางที่ 4.2 แล้วมีเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้ไป 24.27 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144และ168 ชั่วโมง แทบไม่เหลือน้ำตาลในระบบเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C .beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 ของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 และทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.15 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.09×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้น ในเวลา 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 และ360 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีการลดจำนวนลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท ซึ่งก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือกลีเซอรอล ปริมาณกลีเซอรอลลดลงอย่างช้าๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยในชั่วโมงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 360 กลีเซอรอลถูกใช้ไปจนหมด

ตารางที่ 4.18 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

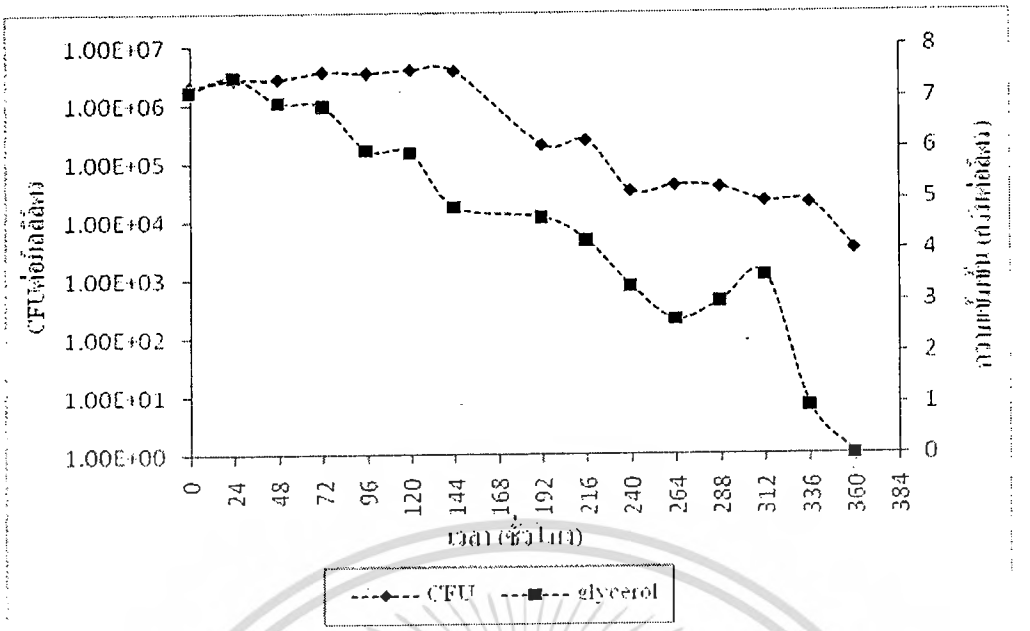
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.09 \pm 0.12 \times 10^6)^{e}$	7.12 ± 0.11^{ab}
24	$(2.76 \pm 0.14 \times 10^6)^{d}$	7.39 ± 0.31^{a}
48	$(2.80 \pm 0.23 \times 10^6)^{d}$	6.90 ± 0.71^{ab}
72	$(3.67 \pm 0.55 \times 10^6)^{bc}$	6.84 ± 0.46^{abc}
96	$(3.51 \pm 0.10 \times 10^6)^{c}$	5.97 ± 0.13^{abc}
120	$(3.97 \pm 0.05 \times 10^6)^{b}$	5.92 ± 0.08^{abcd}
144	$(3.77 \pm 0.24 \times 10^6)^{bc}$	4.85 ± 0.72^{abcd}
168	$(4.78 \pm 0.26 \times 10^6)^{a}$	nd
192	$(2.04 \pm 0.06 \times 10^5)^{f}$	4.64 ± 0.41^{abc}
216	$(2.43 \pm 0.51 \times 10^5)^{f}$	4.188 ± 0.87^{bcd}
240	$(3.25 \pm 0.26 \times 10^4)^{f}$	3.29 ± 0.31^{cdc}
264	$(4.08 \pm 0.07 \times 10^4)^{f}$	2.64 ± 0.35^{cdc}
288	$(3.73 \pm 0.34 \times 10^4)^{f}$	3.00 ± 0.97^{cdc}
312	$(2.15 \pm 0.21 \times 10^4)^{f}$	3.51 ± 0.86^{f}
336	$(2.03 \pm 0.05 \times 10^4)^{f}$	0.94 ± 0.62^{cf}
360	$(3.24 \pm 0.24 \times 10^3)^{f}$	0^{f}

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (---◆---) และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ C .*beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15) เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป จำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากกลูโคสที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 3.93×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 24 ชั่วโมงและค่อยๆ ลดจำนวนลง อันน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้

มีรายงานผลกระทบของความเข้มข้นของสารอาหารในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามรายงานของ Maddox (1995) กล่าวว่า การจำกัดสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะ จะทำให้การเจริญของเซลล์ถูกจำกัดเพราะเกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญไปแม้ว่าจะทราบความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น แต่ก็ไม่ทราบความเข้มข้นของสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักและหลังจากกระบวนการหมัก

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.19 กับ 4.20 และรูปที่ 4.16 กับ 4.17 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *C. beijerinckii* สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.15 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้อาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.57 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 2 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

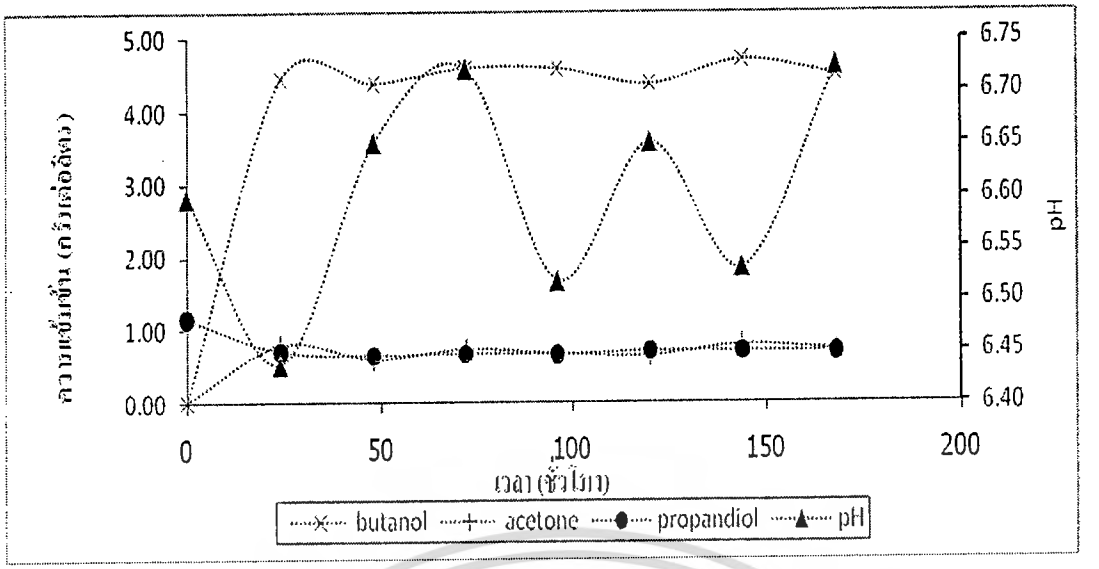
ตารางที่ 4.19 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.53	0^{b}	0^{c}	1.15 ± 0.03^{a}
24	6.44	4.45 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.11^{a}	0.70 ± 0.03^{bc}
48	6.65	4.39 ± 0.23^{a}	0.59 ± 0.18^{b}	0.65 ± 0.01^{d}
72	6.72	4.60 ± 0.11^{a}	0.73 ± 0.04^{ab}	0.67 ± 0.02^{bcd}
96	6.52	4.59 ± 0.25^{a}	0.67 ± 0.08^{ab}	0.66 ± 0.02^{cd}
120	6.65	4.37 ± 0.14^{a}	0.64 ± 0.07^{ab}	0.71 ± 0.01^{b}
144	6.53	4.70 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.09^{a}	0.71 ± 0.02^{b}
168	6.72	4.50 ± 0.22^{a}	0.72 ± 0.05^{ab}	0.70 ± 0.01^{bc}

หมายเหตุ a, b และ cในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล ( ) อะซีโตน ( ) 1,3โพรเพนนอล ( ) และค่าความเป็นกรดด่าง ( ) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.20 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.70	0^{c}	1.57 ± 0.01^{a}
24	6.44	0^{c}	1.39 ± 0.01^{b}
48	6.80	2.41 ± 0.16^{bcd}	0.92 ± 0.08^{d}
72	6.60	1.75 ± 0.06^{d}	1.19 ± 0.02^{c}
96	6.88	2.94 ± 0.13^{abc}	0.73 ± 0.02^{c}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

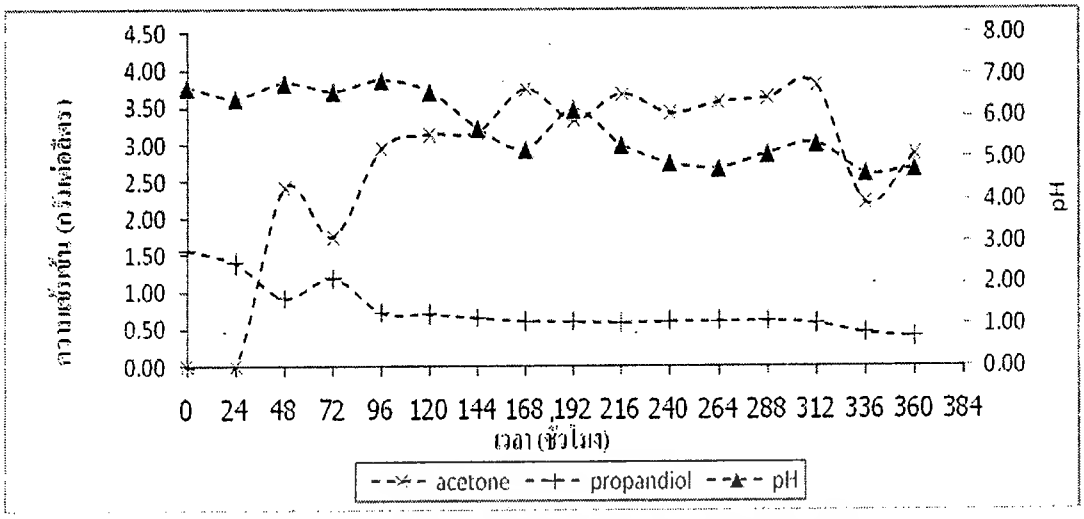
ตารางที่ 4.20 (ต่อ) ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
120	6.60	3.13 ± 0.14^{abc}	0.70 ± 0.05^{e}
144	5.72	3.17 ± 0.15^{abc}	0.65 ± 0.03^{ef}
168	5.22	3.74 ± 0.32^{a}	0.61 ± 0.04^{f}
192	6.66	3.32 ± 0.30^{ab}	0.60 ± 0.01^{f}
216	5.33	3.68 ± 0.25^{a}	0.59 ± 0.01^{f}
240	4.89	3.42 ± 0.27^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
264	4.77	3.57 ± 0.28^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
288	5.10	3.63 ± 0.13^{a}	0.62 ± 0.02^{f}
312	5.36	3.80 ± 0.38^{a}	0.58 ± 0.04^{f}
336	4.65	2.21 ± 0.97^{cd}	0.45 ± 0.14^{g}
360	4.77	2.86 ± 0.09^{abc}	0.40 ± 0.01^{g}

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f และ gในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (-×-) 1,3โพรเพนไดออล (-+-) และค่าความเป็นกรดด่าง (-▲-) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรายงานของ Fermanek และคณะ (1997) พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซิโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อP2 กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ของมอลโตเดร็กส์ติน (maltodextrin) หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Qureshi และคณะ(2008) พบว่าเมื่อเติมกลูโคสปริมาณ 58.8 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 จะสามารถผลิตอะซีโตนได้ 5.44 กรัมต่อลิตร บิวทานอลเป็น 15.21 กรัมต่อลิตร และเอทานอลเป็น 0.41 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักกลูโคสจะถูกใช้ไป 51.4 กรัมต่อลิตร ภายหลังปริมาณกลูโคสจะเหลือเท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

5.1.1 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในสูตรอาหารที่ 1

จากการศึกษาความสามารถในการหมักโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคส ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 120 ที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดจากนั้นจึงเริ่มลดลง มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดลองในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน โดยพบ 2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

โดยจะทำการศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง คือ 4.80×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบแต่เมทานอลซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการหมักให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น (Maintinguer และคณะ , 2008)และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ พบซอร์บิ-ทอลซึ่งมีค่าคงที่ประมาณ 0.53 กรัมต่อลิตรในตัวอย่าง ซึ่งน่าจะเป็นสารปนเปื้อนในกลูโคส เพราะ จุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลเป็นแหล่งอาหารได้

5.1.2 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในสูตรอาหารที่ 2

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เชื้อมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ 1.20×10^7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CFUต่อมิลลิลิตร แปรผันกันกับปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลือเท่ากับ 8.10 กรัมต่อลิตร และการทดลองที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 3.47×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณกลีเซอรอลแปรผกผันกับจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ใช้ปริมาณ กลีเซอรอลไป 1.45 กรัมต่อลิตร จากชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 8.52 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 7.07 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลีเซอรอล เพราะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้

การศึกษากระบวนการหมักและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้กลูโคสและ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเชื้อ 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตรเป็น 1.16×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากเชื้อต้องมีการปรับตัวจาก Innoculumn สู่สภาวะในถังหมักเชื้อจึงมีจำนวนลดลง จากนั้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.03 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อและบ่งชี้ได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารผลิตภัณฑ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล และเอทานอล ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.180 และ 0.031 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น การเจริญของเชื้อมีลักษณะคล้ายกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ผลิตได้เท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรและผลิตโพรเพนไดออลในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.029 กรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของเชื้อจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 มีการเจริญเติบโตลดลงซึ่งขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^7 CFUต่อมิลลิลิตรและในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตบิวทานอลแต่มีการผลิต อะซิโตนในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรและเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเท่ากับ 0.333 กรัมต่อลิตร ปริมาณของเอทานอลลดลงเนื่องจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 2.25 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.027 กรัมต่อลิตร และผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณที่ผลิตได้ คือ 0.025 กรัมต่อลิตร

5.1.3 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

จากการศึกษาความสามารถในการหมักโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้กลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 พบว่าที่ชั่วโมง 24 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดจากนั้นจึงเริ่มลดลง โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.33 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนในการทดลองการเปรียบเทียบในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรกับการใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหาร พบว่าในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.93 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 168 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.78 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ บิวทานอล อะซีโตน และเอทานอล โดยพบว่า เมื่อเติมกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิต บิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย มีข้อเสนอแนะในการทดลองดังต่อไปนี้

1. การทำวิจัยที่เป็นการทดลองในระดับฟลาสก์อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้มาก เนื่องจากควบคุมสภาวะภายในได้ยาก จึงควรที่จะทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักมากกว่า
2. ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์อื่น เนื่องจากในงานวิจัยนี้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณที่น้อย
3. ควรเพิ่มระดับการทดลองลงในถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะที่ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการวารสารเมืองปศุสัตว์. 2549. ระบบไบโอแก๊สในฟาร์มสุกร.*วารสารเมืองปศุสัตว์*. หน้า 12-16.

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์. 2009. การวิจัยพัฒนา เทคโนโลยีการผลิต N-butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และพูลพร แสงบางปลา. 2544. รายงานโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต n-butanol จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน.ทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, สุวัฒนา พวงเพิกศึก, วรพัฒน์ อรรถยุกติ, ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ. 2009. กระบวนการหมักอาซีโตน-บิวทานอล จากมันสำปะหลัง. โครงการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์ : เลขที่ 91-IR-2527

จริยา ชมวารินทร์, กัญญาลักษณ์ ชัยคำภา ,นเรศ วโรภาสตระกูล.2541. แบคทีเรียวิทยาพื้นฐาน. ภาคจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เฉลิงเดช พิลาศรี. 2549. ก๊าซชีวภาพ. ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม หน้า 12-15.

ชัชวาล คำวงศ์, ณัฐวิทย์ พงศ์พันธุ์, นุกูลกิจ ทูนกาศ, วิลาวัลย์ ปันอิ่น, วิไลวรรณ ลีนะกุล. 2552. แอลกอฮอล์.โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถานบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นวลจันทร์ ข้องสาย,สุวิญชา เหลืองวีรชัย.2548.โครงการพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพเรื่อง การศึกษาการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากน้ำคั้นลำต้นข้างฟ่างหวานโดย *Clostridium acetobutylicum* TISR 1462. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์, ลักขณา เหล่าไพบูลย์, วิชัย ลีลาวัชรมาศ, ประสิทธิ์ ใจศีล. 2549. การผลิตบิว-ทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ด้วยวิธีการหมักแบบกะ และกึ่งกะ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาค คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มณีนาฏ ลีนุตพงษ์. 2527. อิทธิพลของการเติมบิวทานอลและกรดบิวทีริกที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมที่แยกได้จากดินในประเทศไทย.ปัญหาพิเศษของนักศึกษาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนที่ 21 ง (11 มี.ค.47) หน้า 7-13 (เอกสารภาษาไทย ชั้น 5)

มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์ มอก. 377-2538 (2538)

รติกร พิทักษ์นรเศรษฐ, รัตน์ณา คงคาทิพย์, ชุติมา นันทเสนา. 2552. การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*. โครงการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิชัย ลีลาวัชรมาศ, ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และประสิทธิ์ ใจศิล. 2548. คณะเทคโนโลยี การศึกษาการผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinkii*

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก.กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือกรุงเทพ.

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. หน้า 93-110.

สมชัย จันทร์สว่าง. 2550. รายงานวิจัยเรื่องเทคโนโลยีแก๊สชีวภาพ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 30-32.

สมพงษ์ ใจมา. 2548. รายงานการวิจัยเรื่องการใช้ประโยชน์จากก๊าซชีวภาพ. รายงานวิศวกรรมพลังงาน สถานเทคโนโลยีก๊าซชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 20.

สุนทร กาญจนเทวี.2537.ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสารละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* จากกากน้ำตาล (Effect of Temperature upon solvent production in batch culture of *Clostridium acetobutylicum* cane molasses). รายงานการวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุวิมล สวยสม. 2550. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบยูเอเอสบี. UASB.*วารสารเทคโนโลยีก๊าซชีวภาพ* ฉบับที่ 6. หน้า 21-22.

อังคณา มุขพลอย และ ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2546. ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากฟางข้าว. โครงการวิจัย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Andrade, JC and Vasconcelos, I. 2003.Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilization. *Biotechnology Letters*. 25: 121-125.

Andreesen, JR, Bahl, H, and Gottschalk, G.1989. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: Minton NP, Clarke DJ, editors. Clostridia. New York: Plenum Press; p. 27–62.

Badr, R. Toledo, M.K. and Hamdy, MK. 2000. Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*. 20(2): 119-132.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bahl H., Andersch W., Gottschalk G.1982. Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 201-205.

Ballongue, J, Amine, J, Masion, E, Petitdemange,H, and Gay,R. 1985. Induction of acetoacetate decarboxylase in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Letters*. 29: 273-277.

Bergmeyer H.U., Grassel M., 1983. Reagents for enzymatic analysis: enzymes-a-amylase. Methods of Enzymatic Analysis. vol. 2 Verlag Chemie.Weinheim. Germany, 151–152.

Biebl, H., K. Menzel, A.-P. Zeng and W.-D. Deckwer. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52 (3): 289-297.

Bowles, LK and Ellefson, WL. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50:1165–1170.

Cynkin, MA and Delwiche, EA. 1958. Metabolism of pentoses by clostridia I: Enzymes of ribose dissimilation in extracts of *Clostridium perfringens*. *The Journal of Bacteriology*. 75: 331–334.

Durre, P. 2008. Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125: 353-362.

Ezeji TC. Qureshi N., Blaschek HP.2005. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Biotechnol*. 115: 179-187.

Fond, O, Matta-Ammouri, G, Petitdemange, H, and Engasser, JM. 1985. The role of acids on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22:195–200.

Formanek J., Mackie R., Blasdhek HP.1997. Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. *App. Environ. Microbiol*. 63: 2306-2310.

Fukada, H, Konda, A and Noda, H. 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5): 405-416.

Girbal, L and Soucaille, P. 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. *The Journal of Bacteriology*. 176: 6433–6438.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hugh AG., Chen JS.1983.Acidic condition are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 321-327.

Jones, DT and Woods, DR. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*. 50: 484–524.

Johnson, MJ, Peterson, WH, and Fred, EB. 1931. Oxidation and reduction relations between substrate and products in the acetone-butyl alcohol fermentation. *The Journal of Biological Chemistry*. 91: 569-591.

Kell, DB, Peck, MW, Rodger, G and Morris, JGX. 1973. On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 99: 81–88.

Kotze, JP. 1969. Glycolytic and related enzymes in clostridial classification. *Applied Microbiology*. 18: 744–747.

Jone, DT and Woods, DR. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiologycal Reviews*. 50: 484-524.

Lee, SY, Park JW, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol Bioeng*, 101:209e28.

Lin, YL and Blaschek HP. 1983. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. *Appl Environ Microbiol.* 45: 966-973.

Liu, SJ, Amidon TE, Wood CD. 2008. Membrane filtration concentration and purification of hydrolyzates from biomass. *J Biobased Mater Bioenergy*. 2:121e34.

Ljungdahl, LG, Hugenholtz, J, and Wiegel, J. 1989. Acetogenic and acid-producing clostridia. In: Minton NP, Clarke DJ, editors. Clostridia. USA, NY: Plenum Press; p. 145–191.

Maintinguer, SI, Fernandes, BS, Duarte, ICS, Saavedra, NK, Adorno, MAT and Varesche, MB. 2008. Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33: 4309–4317.

Maddox IS, Qureshi N, Roberts-Thomson K. 1995. Production of acetone–butanol-ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Process Biochemistry*. 30: 209–215.

Mallinckrodt Chemicals, The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed. 2007, Columbia University Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Makalesi, A. 2008. Enhanced Butanol Production by Mutant Strains of *Clostridium acetobutylicum* in Molasses Medium. *Turkish Journal of Biochemistry*. 33(1): 25-30.

McCutchan WN., Hickey RJ. 1954. The butanol acetone fermentations. *Ind. Ferment.* 1: 347-388.

Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 426–429.

Moreira, AR, Ulmer, DC and Linden, JC. 1981. Butanol toxicity in the butyric fermentation. *Biotechnology & Bioengineering Symposium.* 11: 567–579.

Monot F., Martin J., Petidermange H., Gay R. 1982.Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1318-1324.

Monot F., Engasser JM. 1983. Production of acetone and butanol by batch and continuous culture of *Clostridium acetobutylicum* under nitrogen limitation. *Biotechnol. Lett.* 5: 213-218.

Nolling, J, Breton, G, Omelchenko, MV, Makarova, K, Zeng, Q, and Gibson, R. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum. The Journal of Bacteriology.* 183: 4823–4838.

O'Brien RW., Morris JG. 1971. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum. J. Gen. Microbiol.* 68: 307-318.

Ounine, K, Petitdemange, H, Raval, G, and Gay, R. 1983. Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum. Biotechnology Letters.* 5:605–610.

Pimpa P., Goma G.1986.The biochemistry of variation of solvent ratios in acetone-butanol formentation. Open-file report, CHEM 01-001-1986.Faculty of Science, Chiangmai University. Chiangmai, Thailand.

Parekh M., Formanek J., Blaschek HP.1998. Development of cost effective glucose-corn steep medium for the production of butanol by *Clostridium beijerinckii. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 21: 187–91.

Parekh M., Formanek J., Blaschek HP.1999. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using low-cost fermentation medium based on corn steep water. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51: 152–7.

Qureshi N., Blaschek HP. 1999. Butanol recovery from model solution/fermentation broth by pervaporation: evaluation of membrane performance. Biomass and Bioenergy17, 175–84

Qureshi N., Saha BC., Cotta MA. 2007. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii. Bioprocess and Biosystems Engineering.* 30: 419–427.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Qureshi N., Saha BC., Cotta MA. 2008. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: part II – fed-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 32(2): 176–183.

Qureshi, N, Saha, BC, Hector, RE and Cotta, MA. 2008. Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors. *Biomass and Bioenergy*. 32, 1353-1358.

Qureshi N., Saha BC., Dien B., Hector RE., Cotta MA. 2010. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy*, 34(4): 559 –65.

Qureshi N., Saha BC., Hector RE., Dien B., Hughes SR., Liu S.2010. Production of Butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II - Use of corn stover and switchgrass hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*, 34(4): 566–571.

Rice, EW, Ann H, FransonM, Greenberg AE, Clesceri LS. 2005. In Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed., 5. American Technical Publishers. p. 48e54.

Robinson GC.1922.A study of the acetone and butyl alcohol fermentation of various carbohydrates. *J. Biol. Chem*. 52: 125-155.

Rogers, P. 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology*. 31: 1–60.

Ruchir PD., Lars KN., Eleftherios TP.1999. Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicun* fermentation with non-linear constraints. *J. Biotechnol*. 71,191- 205

Spivey, MJ. 1978. The acetone/butanol/ethanol fermentation. *Process Biochemistry*. 13: 2–5.

Tashiro Y., Takeda K., Kobayashi G., Sonomoto K., Ishjzaki A., Yoshino S .2004. High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *J. Biosci*, 98: 263-268.

Terracciano, JS and Kashket, ER. 1986. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 52: 86–91.

Van Der Westhuizen, A, Jones DT, Woods DR. 1982. Autolytic activity and butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 44. 1277e81.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Van Walsum, GP, Allen SG, Spencer MJ, Laser MS, Antal MJ, Lynd LR. 1996. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 57/58:157e70.

Vollherbst-Schneck, KJA, Sands, A and Montencourt, BS. 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Applied and Environmental Microbiology.* 47:193–194.

Wang, Z, Zhuge, J, Fang, H, Bernard, A. 2008. Glycerol Production by microbial fermentative: A review. *Biotechnology Advances.*19: 201-223.

[Online].Available: ชัชวาล คำวงศ์ และคณะ, 2550. โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (10/07/2552)

[Online].Available: ภานุชนาถ คำเหล็กและสมฤทัย ตาใจ http://www.geocities.com/beejen26/sheet5.htm (10/07/2552)

[Online].Available: www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

[Online].Available: www .biology.clc.uc.edu/courses/bio104/lipids.htm (01/04/2554)

[Online].Available: www.bpe.wur.nl/UK/Research/Projects/Maximal+butanol+yield+by+directed +engineerin/ (25/03/2554)

[Online].Available: www.butanol.com (01/04/2554)

[Online].Available: www.commons.wikimedia.org/wiki/File:Butanol_flat_structure.png (01/04/2554)

[Online].Available: www.en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_beijerinckii (25/03/2554)

[Online].Available: http://www.energyfantasia.com/ef4/pedia/pediashow.php?show=402 (21/09/2553)

[Online].Available: www.eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap1/chapter1_2. html (22/03/2554)

[Online].Available: http://www.foodindustrythailand.com/v17/index.php?option=com_content& view=article&id=531&Itemid=132 (21/09/2553)

[Online].Available: www .genome.jgi-psf.org/clobe/clobe.home.html (22/03/2554)

[Online].Available: www.igetweb.com/www/plantscience/index (25/03/2554)

[Online].Available: www.itd.htc.ac.th/st (22/03/2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available: http://www.kasetcity.com/Thaibioenergy/Story/QAview.asp?id=160 (20/09/2553)

[Online].Available: www.learners.in.th/blog/biochem/171449 (01/04/2554)

[Online].Available: http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem8/pic/Untitled-35.jpg (24/09/2553)

[Online].Available: www .manasu.safety-stou.com/page/6/ (22/03/2554)

[Online].Available: Microbewiki®. http://microbewiki.kenyon.edu/images/e/e8/Clostridium.jpg (10/07/2552)

[Online].Available: www.msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (01/04/2554)

[Online].Available: www.neutron.rmutphysics.com/science-glossary/index.php?option=com_content&task=view&id=12495&Itemid=5 (25/03/2554)

[Online].Available: www.phoenix.eng.psu.ac.th/chem/Project/1-2550/menu%20script/13.pdf (25/03/2554)

[Online].Available: http://www.phoenix.eng.psu.ac.th/qa/KPR/Thesis/Ref_Study_%202551/%E0%B9%80%E0%B8%84%E0%B8%A1%E0%B8%B5/%E0%B8%AA%E0%B8%B8%E0%B8%A3%E0%B8%A8%E0%B8%B1%E0%B8%81%E0%B8%94%E0%B8%B4%E0%B9%8C.pdf (17/10/2553)

[Online].Available: www. phoenix.eng.psu.ac.th/qa/KPR/Thesis/Ref_Study_%202551/เคมี/สุรศักดิ์.pdf (25/03/2554)

[Online].Available: http://pikul.lib.ku.ac.th/cgibin/agre.exe?rec_id=000221&database=agre&search_type=link&table=mona&back_path=/agre/mona&lang=thai&format_name=TFMON (3/04/2554)

[Online].Available: http://www.researchgate.net/publication/27807181 (3 เมษายน 2554)

[Online].Available: http://www.researchgate.net/publication/39024712___n-butanol__ (21/09/2553)

[Online].Available: http://www.sakolraj.ac.th/darunee/bbb5.htm (10/07/2552)

[Online].Available: www.th.wikipedia.org/wiki/glucose (25/03/2554)

[Online].Available: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (23/09/2553)

[Online].Available: http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-25.html (24/09/2553)

[Online].Available: http://thaimisc.pukpik.com/freewebboard/php/vreply.php?user=alls&topic=668&page=1 (20/09/2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available: http://timnovate.wordpress.com/2009/06/ (23/09/2552)

[Online].Available: www .variety.teenee.com/science/2801.html (01/04/2554)

[Online].Available: www.vicharkarn.com/vcafe/35533 (25/03/2554)

[Online].Available: www.weekendhobby.com/offroad/newenergy/Question.asp?ID=1684 (25/03/2554)

[Online].Available: WIKIPEDIA®. Butanol. http://en.wikipedia.org/wiki/Butanol. (20/06/2552).

[Online].Available: www.wtt-lite.nist.gov/cgi-bin/openindex.cgi?cid=78922 (25/03/2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน

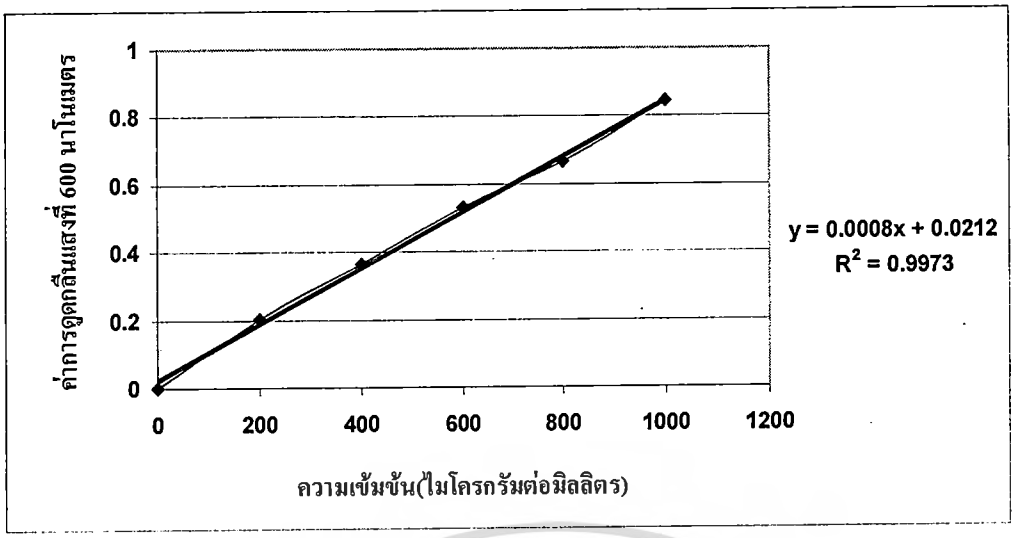
การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานเตรียมได้ดังนี้ นำน้ำตาลกลูโคสไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมได้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Dinitrosalicilic acid (DNS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ผลดังตารางที่ ก.1 และ ก.2

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
200	0.202
400	0.364
600	0.530
800	0.666
1000	0.846

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

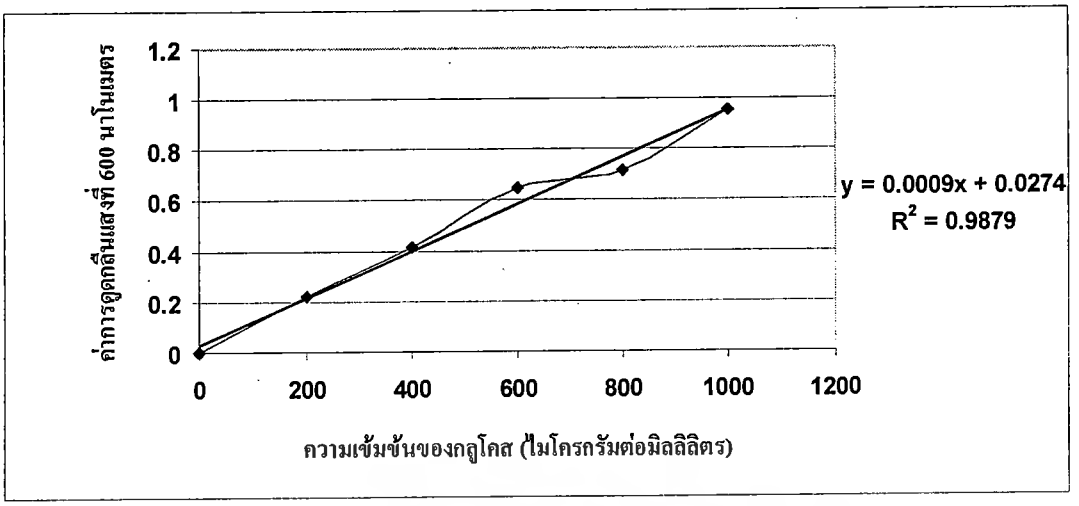


รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์

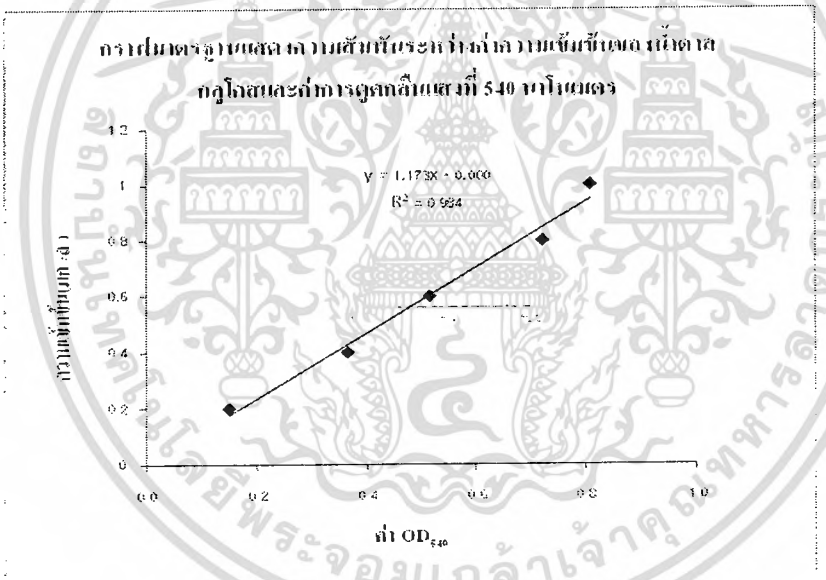
ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0
200	0.219
400	0.414
600	0.646
800	0.719
1000	0.955

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



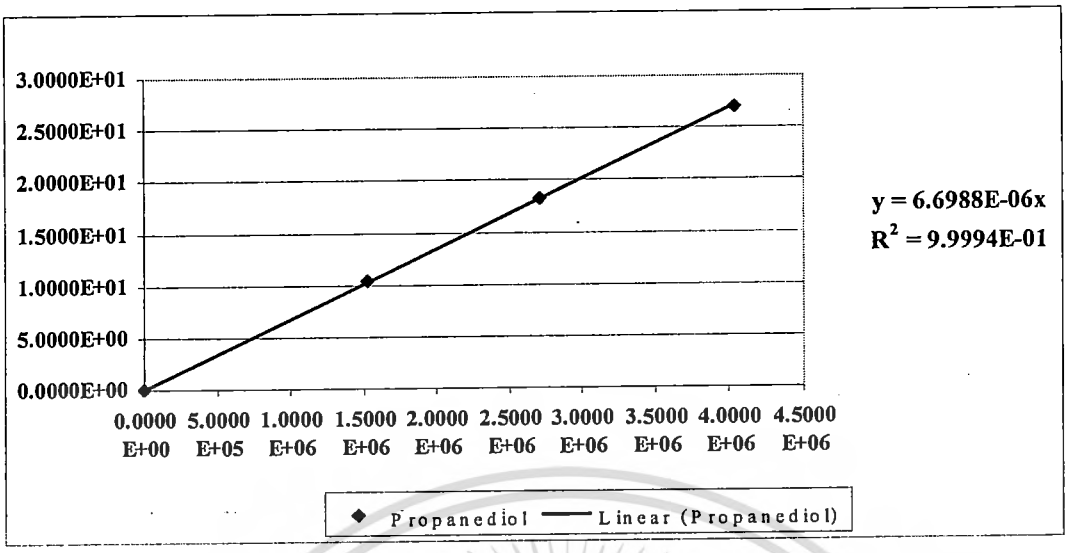
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium acetobutylicum* ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร



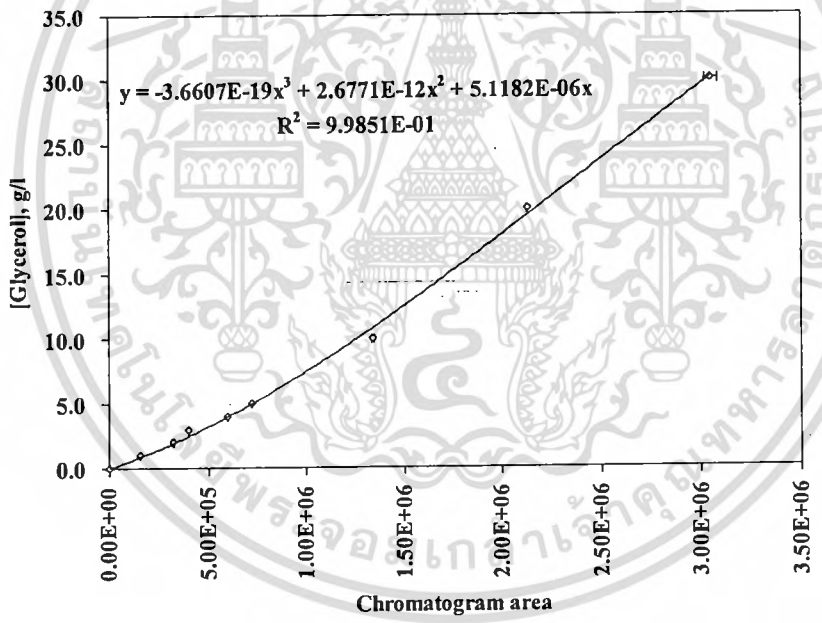
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium beijerinckii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานของสารต่างๆ จากการวิเคราะด้วยเครื่อง HPLC

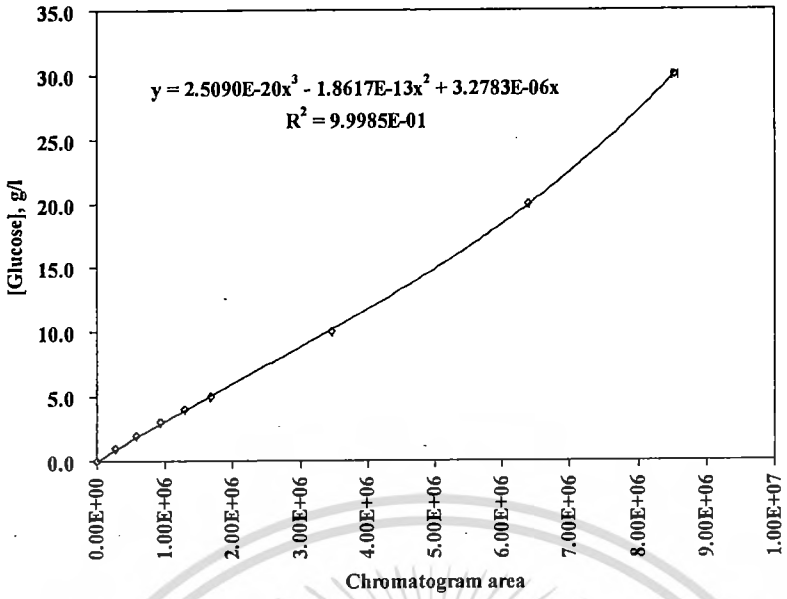


รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของ 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC

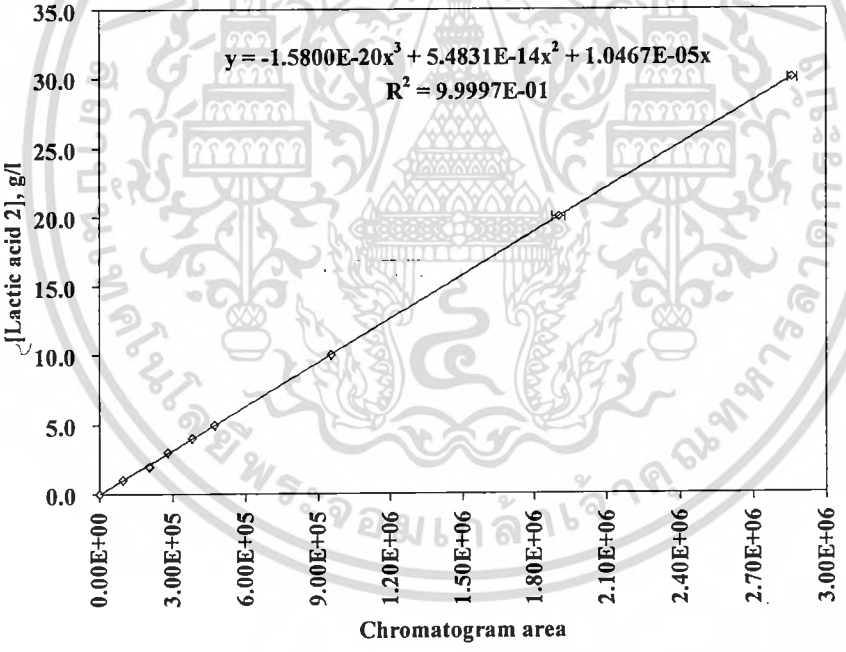


รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

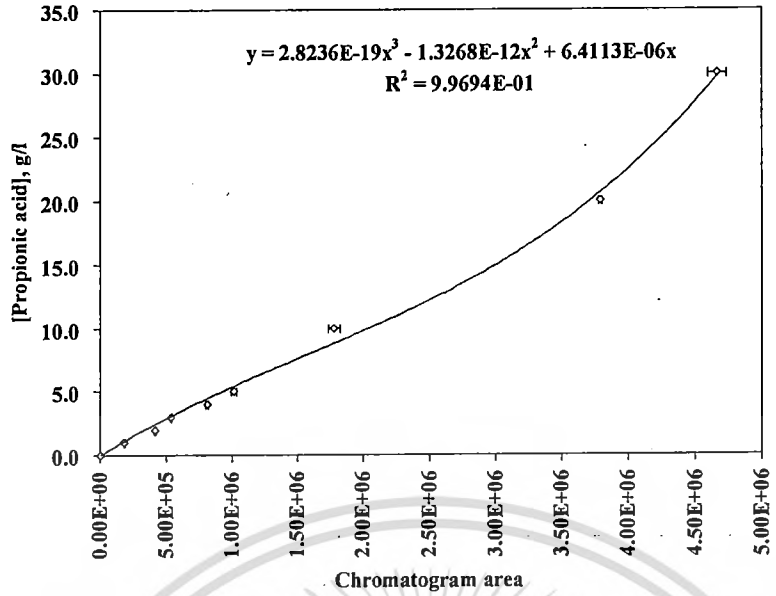


รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

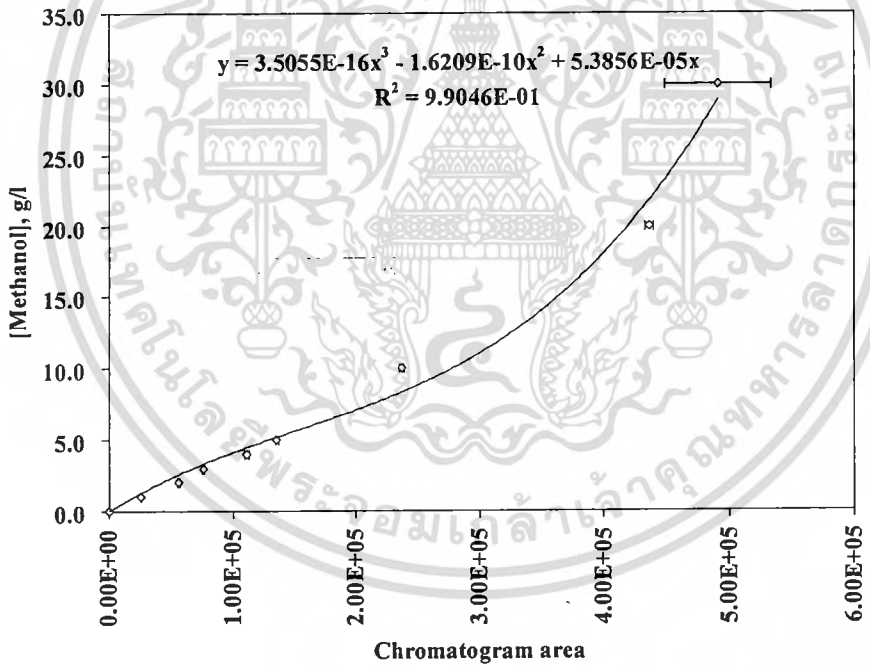


รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

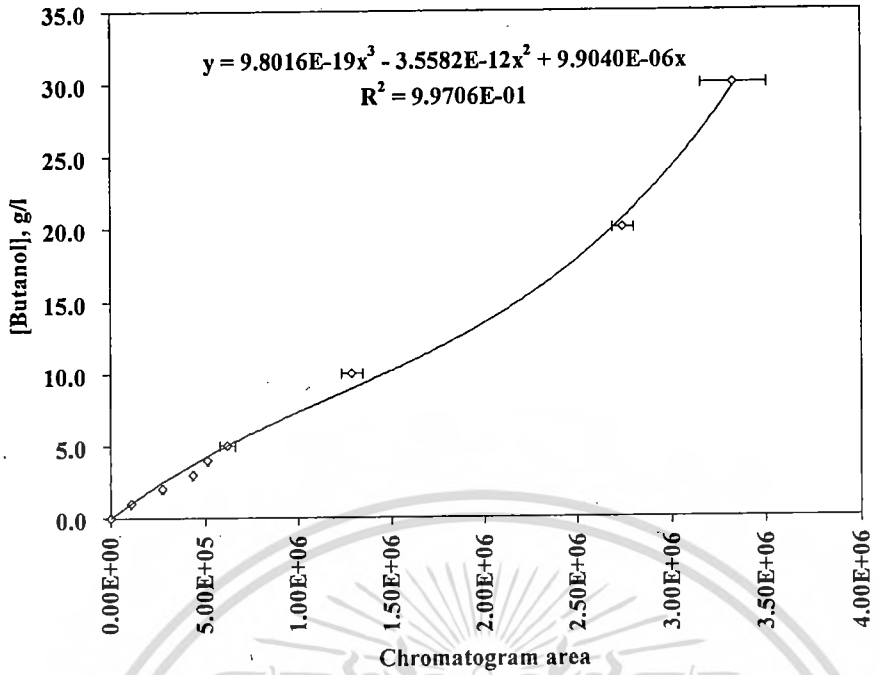


รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาโอนิคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

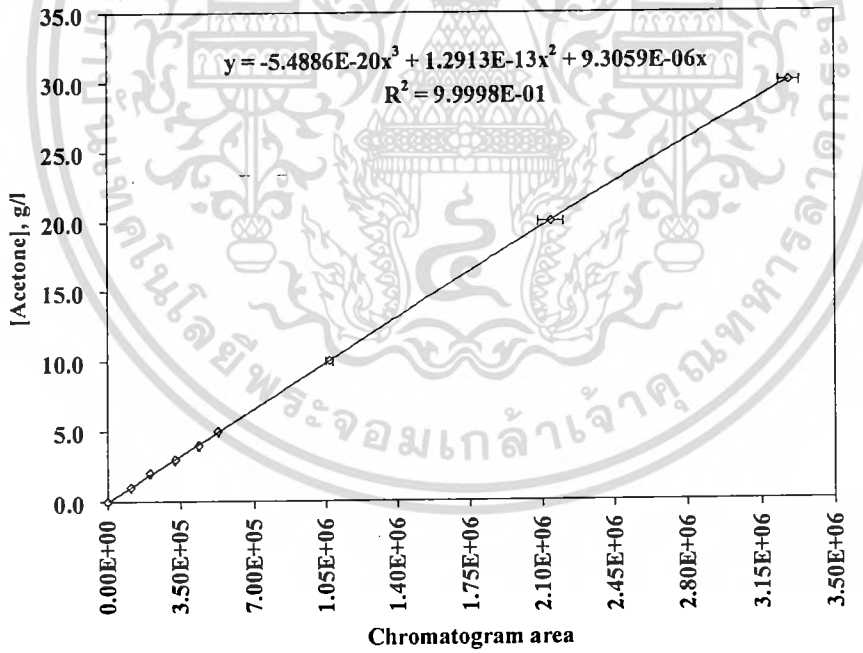


รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

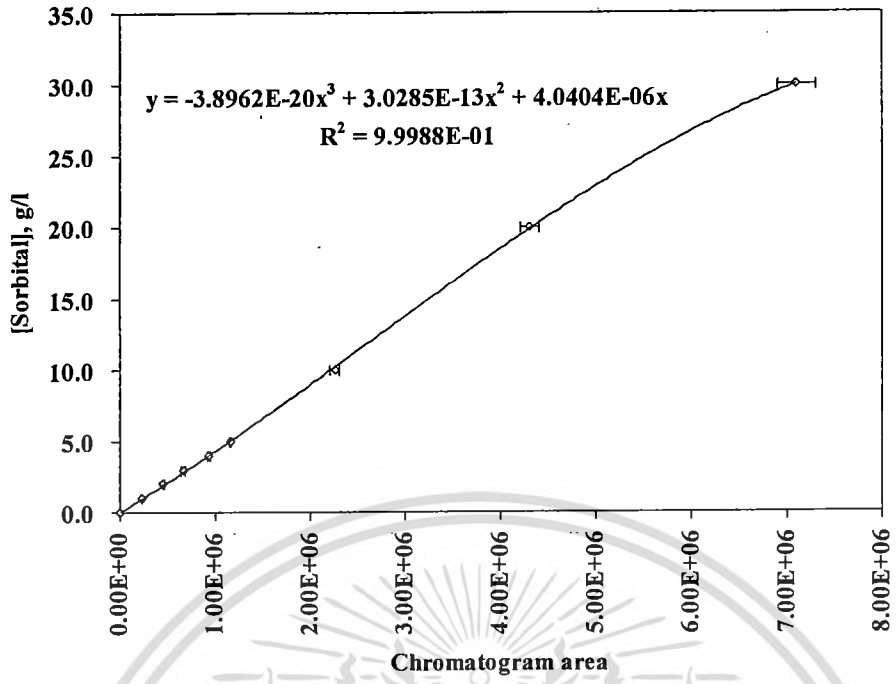


รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



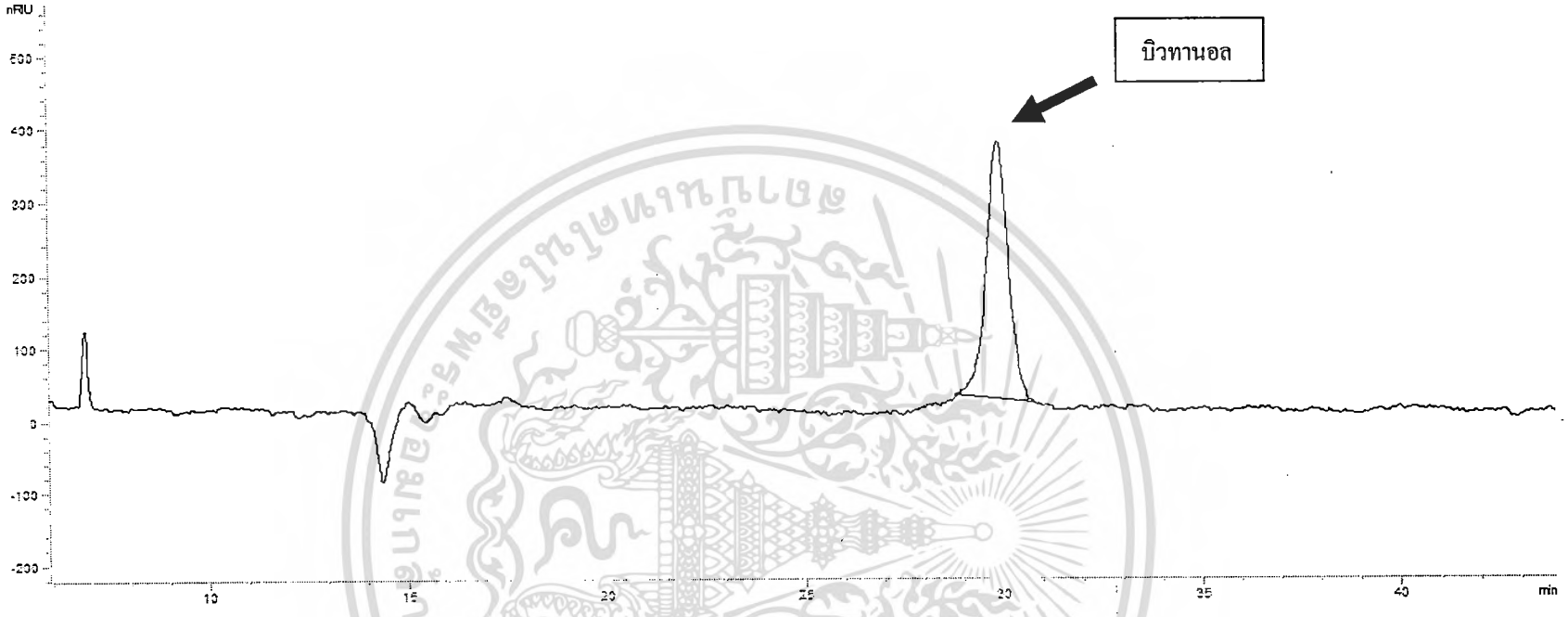
รูปที่ ก.11 กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



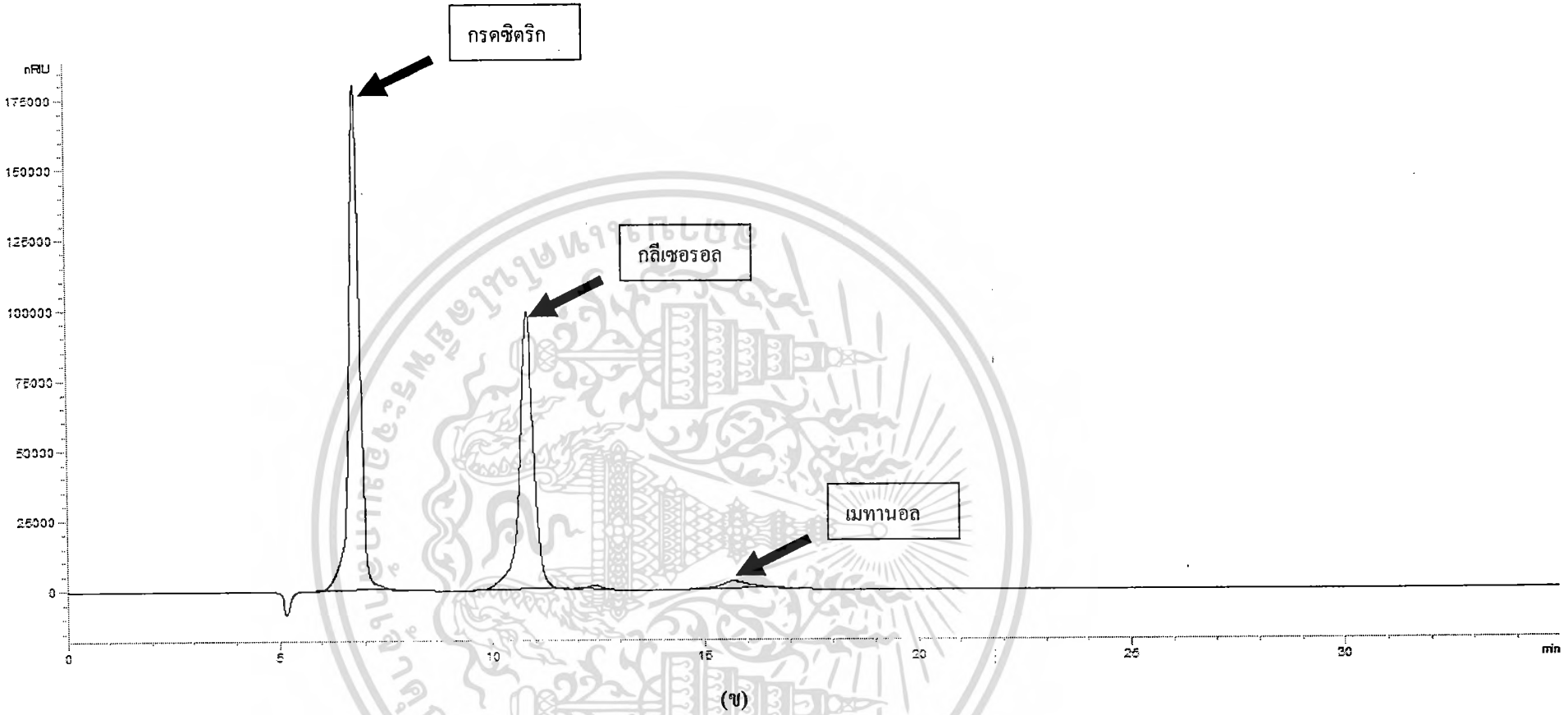
รูปที่ ก.12 กราฟมาตรฐานของซอร์บิทอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.13 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ (ก) บิวทานอลมาตรฐาน (ข) ตัวอย่างที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ ก.13 (ต่อ)โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ (ก) บิวทานอลมาตรฐาน (ข) ตัวอย่างที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 1

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_0 hr.	3	1.9667E6	2.82902E5	1.63333E5	1.2639E6	2.6694E6	1730000.00	2280000.00
growth_24 hr.	3	2.2000E6	1.27671E5	73711.14796	1.8828E6	2.5172E6	2090000.00	2340000.00
growth_48 hr.	3	3.2333E7	2.30940E6	1.33333E6	2.6596E7	3.8070E7	31000000.00	35000000.00
growth_72 hr.	3	1.6667E7	5.77350E5	3.33333E5	1.5232E7	1.8101E7	16000000.00	17000000.00
growth_96 hr.	3	2.4667E7	2.30940E6	1.33333E6	1.8930E7	3.0404E7	22000000.00	26000000.00
growth_120 hr.	3	1.3300E8	2.91033E7	1.68028E7	6.0703E7	2.0530E8	1.00E8	1.55E8
growth_144 hr.	3	1.7000E7	4.58258E6	2.64575E6	5.6163E6	2.8384E7	13000000.00	22000000.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
growth_168 hr.	3	2.6567E6	1.19542E6	6.90177E5	-312925.7637	5.6263E6	1710000.00	4000000.00
Total	24	2.8811E7	4.25365E7	8.68274E6	1.0850E7	4.6773E7	1710000.00	1.55E8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ...

ANOVA

cell (CFU/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.985E16	7	5.693E15	51.728	.000
Within Groups	1.761E15	16	1.101E14		
Total	4.162E16	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

growth_hr	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
growth_0 hr.	3	1.9667E6		
growth_24 hr.	3	2.2000E6		
growth_168 hr.	3	2.6567E6		
growth_72 hr.	3	1.6667E7	1.6667E7	
growth_144 hr.	3	1.7000E7	1.7000E7	
growth_96 hr.	3		2.4667E7	
growth_48 hr.	3		3.2333E7	
growth_120 hr.	3			1.3300E8
Sig.		.131	.111	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคส

Oneway

Descriptives

cell(CFU/mL)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
glucose_0 hr	3	1.4267E6	2.41730E5	1.39563E5	826176.3637	2.0272E6	1170000.00	1650000.00
glucose_24 hr	3	1.8000E7	2.00000E6	1.15470E6	1.3032E7	2.2968E7	16000000.00	20000000.00
glucose_48 hr	3	1.3333E7	3.05505E6	1.76383E6	5.7442E6	2.0922E7	10000000.00	16000000.00
glucose_72 hr	3	2.3333E6	1.52753E6	8.81917E5	-1.4612E6	6.1279E6	1000000.00	4000000.00
glucose_96 hr	3	2.6667E6	1.52753E6	8.81917E5	-1.1279E6	6.4612E6	1000000.00	4000000.00
glucose_120 hr	3	2.6667E10	1.52753E10	8.81917E9	-1.1279E10	6.4612E10	1.00E10	4.00E10
glucose_144 hr	3	2.1333E7	8.50490E6	4.91031E6	205989.1471	4.2461E7	15000000.00	31000000.00
glucose_168 hr	3	4.3333E6	2.08167E6	1.20185E6	-837811.6792	9.5045E6	2000000.00	6000000.00
Total	24	3.3413E9	1.00695E10	2.05542E9	-9.1070E8	7.5932E9	1000000.00	4.00E10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

cell(CFU/mL)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.865E21	7	2.665E20	9.137	.000
Within Groups	4.667E20	16	2.917E19		
Total	2.332E21	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell(CFU/mL)

Duncan[a]

glucose_growth_curve	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
glucose_0 hr	3	1.4267E6	
glucose_72 hr	3	2.3333E6	
glucose_96 hr	3	2.6667E6	
glucose_168 hr	3	4.3333E6	
glucose_48 hr	3	1.3333E7	
glucose_24 hr	3	1.8000E7	
glucose_144 hr	3	2.1333E7	
glucose_120 hr	3		2.6667E10
Sig.		.997	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

CFU/mL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
gly 10g/L_0 hr	3	1.3733E6	1.13725E5	65659.05201	1.0908E6	1.6558E6	1280000.00	1500000.00
gly 10g/L_96 hr	3	300000.0000	1.55242E5	89628.86440	-85641.8781	685641.8781	140000.00	450000.00
gly 10g/L_120 hr	3	536666.6667	2.21209E5	1.27715E5	-12846.4563	1.0862E6	330000.00	770000.00
gly 10g/L_144 hr	3	1.6333E7	4.04145E6	2.33333E6	6.2938E6	2.6373E7	12000000.00	20000000.00
Total	12	4.6358E6	7.27432E6	2.09991E6	13952.3165	9.2577E6	140000.00	20000000.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Copyright© by Kasetsart University
All rights reserved

ANOVA

CFU/mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.492E14	3	1.831E14	44.601	.000
Within Groups	3.284E13	8	4.105E12		
Total	5.821E14	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/mL

Duncan[a]

gly 10 g/L	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
gly 10g/L_96 hr	3	300000.0000	
gly 10g/L_120 hr	3	536666.6667	
gly 10g/L_0 hr	3	1.3733E6	
gly 10g/L_144 hr	3		1.6333E7
Sig.		.551	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

CFU/mL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
gly 20 g/L_0 hr	3	1.2133E6	94516.31253	54569.01848	978541.7970	1.4481E6	1140000.00	1320000.00
gly 20 g/L_96 hr	3	7.7200E7	5.48755E7	3.16824E7	-5.9118E7	2.1352E8	14600000.00	1.17E8
gly 20 g/L_120 hr	3	1.9733E8	1.61658E7	9.33333E6	1.5718E8	2.3749E8	1.80E8	2.12E8
gly 20 g/L_144 hr	3	2.0067E8	8.63964E7	4.98810E7	-1.3954E7	4.1529E8	1.43E8	3.00E8
Total	12	1.1910E8	9.85132E7	2.84383E7	5.6511E7	1.8170E8	1140000.00	3.00E8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

CFU/mL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.528E16	3	2.843E16	10.590	.004
Within Groups	2.147E16	8	2.684E15		
Total	1.068E17	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/mL

Duncan[a]

gly 20 g/L	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
gly 20 g/L_0 hr	3	1.2133E6	
gly 20 g/L_96 hr	3	7.7200E7	
gly 20 g/L_120 hr	3		1.9733E8
gly 20 g/L_144 hr	3		2.0067E8
Sig.		.110	.939

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
gly 30 g/L_0 hr	3	1.1300E6	1.12694E5	65064.07099	850051.8974	1.4099E6	1000000.00	1200000.00
gly 30 g/L_96 hr	3	1.3600E8	4.39659E7	2.53837E7	2.6783E7	2.4522E8	1.00E8	1.85E8
gly 30 g/L_120 hr	3	1.6433E8	3.10859E7	1.79475E7	8.7112E7	2.4155E8	1.43E8	2.00E8
gly 30 g/L_144 hr	3	1.0000E7	2.00000E6	1.15470E6	5.0317E6	1.4968E7	8000000.00	12000000.00
Total	12	7.7866E7	7.96913E7	2.30049E7	2.7232E7	1.2850E8	1000000.00	2.00E8

ANOVA

CFU/ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.405E16	3	2.135E16	29.415	.000
Within Groups	5.807E15	8	7.258E14		
Total	6.986E16	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml

Duncan[a]

gly 30 g/L	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
gly 30 g/L_0 hr	3	1.1300E6	
gly 30 g/L_144 hr	3	1.0000E7	
gly 30 g/L_96 hr	3		1.3600E8
gly 30 g/L_120 hr	3		1.6433E8
Sig.		.697	.234

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
gly 40 g/l_0 hr	3	1.3033E6	30550.50463	17638.34207	1.2274E6	1.3792E6	1270000.00	1330000.00
gly 40 g/l_96 hr	3	1.2967E6	1.09697E5	63333.33333	1.0242E6	1.5692E6	1210000.00	1420000.00
gly 40 g/l_120 hr	3	5.3333E8	2.51661E8	1.45297E8	-9.1828E7	1.1585E9	3.00E8	8.00E8
gly 40 g/l_144 hr	3	4.8000E9	8.54400E8	4.93288E8	2.6776E9	6.9224E9	4.00E9	5.70E9
Total	12	1.3340E9	2.13639E9	6.16723E8	-2.3415E7	2.6914E9	1210000.00	5.70E9

ลิขสิทธิ์เป็นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือจำหน่าย เพื่อประโยชน์ทางการค้า
ในกรณีที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ในกรณีที่ได้รับอนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

CFU/ml

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.862E19	3	1.621E19	81.713	.000
Within Groups	1.587E18	8	1.983E17		
Total	5.021E19	11			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml

Duncan[a]

gly 40 g	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
gly 40 g/l_96 hr	3	1.2967E6	
gly 40 g/l_0 hr	3	1.3033E6	
gly 40 g/l_120 hr	3	5.3333E8	
gly 40 g/l_144 hr	3		4.8000E9
Sig.		.198	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

Oneway

Descriptives

CFU/mL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	5	3.7040E6	1.20716E6	5.39857E5	2.2051E6	5.2029E6	2600000.00	5100000.00
24 hour	4	6.8750E6	3.34402E6	1.67201E6	1.5539E6	1.2196E7	4000000.00	10600000.00
48 hour	3	2.3167E6	2.01080E5	1.16094E5	1.8172E6	2.8162E6	2150000.00	2540000.00
72 hour	6	5.9333E6	9.56110E6	3.90330E6	-4.1004E6	1.5967E7	400000.00	25000000.00
96hour	3	1.1960E7	1.66300E7	9.60133E6	-2.9351E7	5.3271E7	280000.00	31000000.00
120 hour	3	9.5667E6	4.86450E6	2.80852E6	-2.5174E6	2.1651E7	4000000.00	13000000.00
144 hour	2	5.3300E6	5.33159E6	3.77000E6	-4.2572E7	5.3232E7	1560000.00	9100000.00
Total	26	9.9904E6	1.81273E7	3.55506E6	2.6686E6	1.7312E7	280000.00	91000000.00

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.275E15	6	7.126E14	3.437	.018
Within Groups	3.940E15	19	2.073E14		
Total	8.215E15	25			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml			
Duncan[a,,b]			
		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
48 hour	3	2.3167E6	
0 hour	5	3.7040E6	
72 hour	6	5.9333E6	
24 hour	4	6.8750E6	
120 hour	3	9.5667E6	
96hour	3	1.1960E7	
144 hour	2		5.3300E7
Sig.		.454	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.307.			
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	2.5700E6	2.20198E6	1.27131E6	-2.9000E6	8.0400E6	1200000.00	5110000.00
24 hour	3	3.4667E7	1.60226E7	9.25065E6	-5.1356E6	7.4469E7	21000000.00	52300000.00
48 hour	6	3.5567E6	3.37688E6	1.37860E6	12850.2871	7.1005E6	440000.00	9300000.00
72 hour	3	3.2333E6	1.49778E6	8.64741E5	-487348.8331	6.9540E6	2000000.00	4900000.00
96hour	3	1.0873E6	1.57008E6	9.06488E5	-2.8130E6	4.9876E6	152000.00	2900000.00
120 hour	5	2.1560E7	3.35322E7	1.49961E7	-2.0076E7	6.3196E7	2000000.00	80000000.00
144 hour	3	8.7333E6	3.77536E6	2.17970E6	-645177.5952	1.8112E7	4600000.00	12000000.00
Total	26	1.0770E7	1.83183E7	3.59252E6	3.3708E6	1.8169E7	152000.00	80000000.00

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.273E15	6	5.455E14	2.026	.112
Within Groups	5.116E15	19	2.692E14		
Total	8.389E15	25			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml			
Duncan[a,,b]			
		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
96hour	3	1.0873E6	
0 hour	3	2.5700E6	
72 hour	3	3.2333E6	
48 hour	6	3.5567E6	
144 hour	3	8.7333E6	8.7333E6
120 hour	5	2.1560E7	2.1560E7
24 hour	3		3.4667E7
Sig.		.162	.063
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.443.			
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	7.5666E6	2.65393E5	1.53225E5	97394.4270	1.4159E6	500000.00	1030000.00
24 hour	3	1.1600E6	3.76431E5	2.17332E5	224894.5395	2.0951E6	730000.00	1430000.00
48 hour	3	2.4333E6	5.68624E5	3.28295E5	1.0208E6	3.8459E6	1800000.00	2900000.00
72 hour	2	1.5850E7	9.68736E6	6.85000E6	-7.1188E7	1.0289E8	9000000.00	22700000.00
96hour	3	8.0333E7	5.43538E7	3.13812E7	-5.4689E7	2.1536E8	46000000.00	1.43E8
120 hour	5	2.6040E8	5.69807E7	2.54825E7	1.8965E8	3.3115E8	2.14E8	3.50E8
144 hour	3	3.9333E7	4.04145E6	2.33333E6	2.9294E7	4.9373E7	35000000.00	43000000.00
Total	22	7.7534E7	1.09183E8	2.32778E7	2.9125E7	1.2594E8	500000.00	3.50E8

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.313E17	6	3.855E16	30.399	.000
Within Groups	1.902E16	15	1.268E15		
Total	2.503E17	21			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml				
Duncan[a,,b]				
		Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2	3
0 hour	3	756666.6667		
24 hour	3	1.1600E6		
48 hour	3	2.4333E6		
72 hour	2	1.5850E7	1.5850E7	
144 hour	3	3.9333E7	3.9333E7	
96hour	3		8.0333E7	
120 hour	5			2.6040E8
Sig.		.251	.053	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.958.				
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	2.4267E7	4.23950E6	2.44767E6	1.3735E7	3.4798E7	20400000.00	28800000.00
24 hour	3	1.1600E6	3.76431E5	2.17332E5	224894.5395	2.0951E6	730000.00	1430000.00
48 hour	3	2.0767E8	4.46580E7	2.57833E7	9.6730E7	3.1860E8	1.61E8	2.50E8
72 hour	3	2.0333E9	7.00381E8	4.04365E8	2.9349E8	3.7732E9	1.32E9	2.72E9
96hour	3	8.2667E8	3.78594E7	2.18581E7	7.3262E8	9.2071E8	8.00E8	8.70E8
120 hour	3	2.2400E9	1.73205E8	1.00000E8	1.8097E9	2.6703E9	2.14E9	2.44E9
144 hour	3	1.5367E9	2.11975E8	1.22384E8	1.0101E9	2.0632E9	1.31E9	1.73E9
Total	21	9.8139E8	9.38974E8	2.04901E8	5.5398E8	1.4088E9	730000.00	2.72E9

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.650E19	6	2.749E18	33.828	.000
Within Groups	1.138E18	14	8.127E16		
Total	1.763E19	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
treatment	N	1	2	3	4
24 hour	3	1.1600E6			
0 hour	3	2.4267E7			
48 hour	3	2.0767E8			
96hour	3		8.2667E8		
144 hour	3			1.5367E9	
72 hour	3			2.0333E9	2.0333E9
120 hour	3				2.2400E9
Sig.		.414	1.000	.051	.390
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

CFU/ml

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	6	3.6633E6	5.80178E6	2.36857E6	-2.4253E6	9.7519E6	140000.00	15300000.00
24 hour	4	2.1575E6	6.66752E5	3.33376E5	1.0965E6	3.2185E6	1300000.00	2800000.00
48 hour	3	1.2580E7	1.31850E7	7.61238E6	-2.0173E7	4.5333E7	1140000.00	27000000.00
72 hour	3	2.1933E7	5.55098E6	3.20486E6	8.1439E6	3.5723E7	16000000.00	27000000.00
96hour	2	5.7250E7	5.33866E7	3.77500E7	-4.2241E8	5.3691E8	19500000.00	95000000.00
120 hour	3	1.7100E7	9.43981E6	5.45008E6	-6.3498E6	4.0550E7	11600000.00	28000000.00
144 hour	4	2.8523E7	4.59481E7	2.29741E7	-4.4591E7	1.0164E8	1190000.00	97000000.00
Total	25	1.6562E7	2.56478E7	5.12956E6	5.9747E6	2.7148E7	140000.00	97000000.00

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.846E15	6	9.744E14	1.764	.163
Within Groups	9.941E15	18	5.523E14		
Total	1.579E16	24			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml			
Duncan[a,,b]			
		Subset for alpha = 0.05	
treatment	N	1	2
24 hour	4	2.1575E6	
0 hour	6	3.6633E6	
48 hour	3	1.2580E7	
120 hour	3	1.7100E7	1.7100E7
72 hour	3	2.1933E7	2.1933E7
144 hour	4	2.8523E7	2.8523E7
96hour	2		5.7250E7
Sig.		.220	.060
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.231.			
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives								
CFU/ml								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	2.1067E7	3.77536E6	2.17970E6	1.1688E7	3.0445E7	17800000.00	25200000.00
24 hour	3	1.6533E7	2.85715E6	1.64958E6	9.4358E6	2.3631E7	14500000.00	19800000.00
48 hour	6	9.3783E7	8.66494E7	3.53745E7	2.8503E6	1.8472E8	19600000.00	2.35E8
72 hour	2	1.8250E8	9.54594E7	6.75000E7	-6.7517E8	1.0402E9	1.15E8	2.50E8
96hour	3	2.2533E8	4.03774E7	2.33119E7	1.2503E8	3.2564E8	1.79E8	2.53E8
120 hour	2	9.5500E6	9.12168E6	6.45000E6	-7.2405E7	9.1505E7	3100000.00	16000000.00
144 hour	3	2.1733E8	3.10859E7	1.79475E7	1.4011E8	2.9455E8	1.96E8	2.53E8
Total	22	1.0853E8	9.96660E7	2.12489E7	6.4338E7	1.5272E8	3100000.00	2.53E8

ANOVA					
CFU/ml					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.566E17	6	2.610E16	7.534	.001
Within Groups	5.197E16	15	3.465E15		
Total	2.086E17	21			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CFU/ml				
Duncan[a,,b]				
		Subset for alpha = 0.05		
treatment	N	1	2	3
120 hour	2	9.5500E6		
24 hour	3	1.6533E7		
0 hour	3	2.1067E7		
48 hour	6	9.3783E7	9.3783E7	
72 hour	2		1.8250E8	1.8250E8
144 hour	3			2.1733E8
96hour	3			2.2533E8
Sig.		.139	.095	.427

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.800.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hour	3	8.5167	.07572	.04372	8.3286	8.7048	8.43	8.57
24 hour	3	9.1167	.54903	.31698	7.7528	10.4805	8.61	9.70
48 hour	3	7.4533	.02082	.01202	7.4016	7.5050	7.43	7.47
72 hour	3	7.5533	.08505	.04910	7.3421	7.7646	7.49	7.65
96 hour	3	7.5967	.03055	.01764	7.5208	7.6726	7.57	7.63
120 hour	3	7.5667	.08505	.04910	7.3554	7.7779	7.48	7.65
144 hour	3	7.0700	.91799	.53000	4.7896	9.3504	6.01	7.60
Total	21	7.8390	.75730	.16526	7.4943	8.1838	6.01	9.70

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.139	6	1.523	9.146	.000
Within Groups	2.331	14	.167		
Total	11.470	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
		Subset for alpha = 0.05	
gly	N	1	2
144 hour	3	7.0700	
48 hour	3	7.4533	
72 hour	3	7.5533	
120 hour	3	7.5667	
96 hour	3	7.5967	
0hour	3		8.5167
24 hour	3		9.1167
Sig.		.173	.093
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	21.0367	.12503	.07219	20.7261	21.3473	20.95	21.18
24 hour	3	21.4300	.20881	.12055	20.9113	21.9487	21.19	21.57
48 hour	3	21.5233	.15695	.09062	21.1334	21.9132	21.40	21.70
72 hour	3	21.4900	.10536	.06083	21.2283	21.7517	21.38	21.59
96 hour	3	21.5733	.12583	.07265	21.2608	21.8859	21.44	21.69
120 hour	3	21.7667	.10970	.06333	21.4942	22.0392	21.68	21.89
144 hour	3	22.0267	.01155	.00667	21.9980	22.0554	22.02	22.04
Total	21	21.5495	.30957	.06755	21.4086	21.6904	20.95	22.04

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.671	6	.278	15.852	.000
Within Groups	.246	14	.018		
Total	1.917	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร					
Duncan[a]					
Glycerol	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0 hour	3	21.0367			
24 hour	3		21.4300		
72 hour	3		21.4900		
48 hour	3		21.5233		
96 hour	3		21.5733	21.5733	
120 hour	3			21.7667	
144 hour	3				22.0267
Sig.		1.000	.241	.096	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	21.8267	.05033	.02906	21.7016	21.9517	21.78	21.88
24 hour	3	22.0500	.05292	.03055	21.9186	22.1814	22.01	22.11
48 hour	3	22.8767	.14012	.08090	22.5286	23.2247	22.72	22.99
72 hour	3	22.5367	.11060	.06386	22.2619	22.8114	22.42	22.64
96 hour	3	22.9733	.08083	.04667	22.7725	23.1741	22.90	23.06
120 hour	3	22.8967	.00577	.00333	22.8823	22.9110	22.89	22.90
144 hour	3	22.9900	.08544	.04933	22.7778	23.2022	22.90	23.07
Total	21	22.5929	.45732	.09980	22.3847	22.8010	21.78	23.07

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.081	6	.680	93.227	.000
Within Groups	.102	14	.007		
Total	4.183	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
Glycerol	N	1	2	3	4
0 hour	3	21.8267			
24 hour	3		22.0500		
72 hour	3			22.5367	
48 hour	3				22.8767
120 hour	3				22.8967
96 hour	3				22.9733
144 hour	3				22.9900
Sig.		1.000	1.000	1.000	.155
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size =.3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ **ข.16** การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0243	.00321	.00186	.0163	.0323	.02	.03
24 hour	3	.0763	.04706	.02717	-.0406	.1932	.02	.10
48 hour	3	.0690	.03897	.02250	-.0278	.1658	.05	.11
72 hour	3	.1037	.00416	.00240	.0933	.1140	.10	.11
96 hour	3	.1340	.01082	.00624	.1071	.1609	.13	.15
120 hour	3	.1237	.00208	.00120	.1185	.1288	.12	.13
144 hour	3	.1300	.00866	.00500	.1085	.1515	.13	.14
Total	21	.0944	.04295	.00937	.0749	.1140	.02	.15

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.029	6	.005	8.543	.000
Within Groups	.008	14	.001		
Total	.037	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Acetone	N	1	2	3
0 hour	3	.0243		
48 hour	3		.0690	
24 hour	3		.0763	
72 hour	3		.1037	.1037
120 hour	3			.1237
144 hour	3			.1300
96 hour	3			.1340
Sig.		1.000	.111	.171
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0243	.00321	.00186	.0163	.0323	.02	.03
24 hour	3	.0763	.04706	.02717	-.0406	.1932	.02	.10
48 hour	3	.0690	.03897	.02250	-.0278	.1658	.05	.11
72 hour	3	.1037	.00416	.00240	.0933	.1140	.10	.11
96 hour	3	.1340	.01082	.00624	.1071	.1609	.13	.15
120 hour	3	.1237	.00208	.00120	.1185	.1288	.12	.13
144 hour	3	.1300	.00866	.00500	.1085	.1515	.13	.14
Total	21	.0944	.04295	.00937	.0749	.1140	.02	.15

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.029	6	.005	8.543	.000
Within Groups	.008	14	.001		
Total	.037	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Acetone	N	1	2	3
0 hour	3	.0243		
48 hour	3		.0690	
24 hour	3		.0763	
72 hour	3		.1037	.1037
120 hour	3			.1237
144 hour	3			.1300
96 hour	3			.1340
Sig.		1.000	.111	.171
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
24 hour	3	.0630	.00624	.00361	.0475	.0785	.06	.07
48 hour	3	.0617	.00493	.00285	.0494	.0739	.06	.07
72 hour	3	.0640	.00200	.00115	.0590	.0690	.06	.07
96 hour	3	.0653	.00231	.00133	.0596	.0711	.06	.07
120 hour	3	.0613	.00231	.00133	.0556	.0671	.06	.06
144 hour	3	.0610	.00100	.00058	.0585	.0635	.06	.06
Total	21	.0538	.02271	.00496	.0434	.0641	.00	.07

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	6	.002	150.039	.000
Within Groups.	.000	14	.000		
Total	.010	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
		Subset for alpha = 0.05	
butanol	N	1	2
0 hour	3	.0000	
144 hour	3		.0610
120 hour	3		.0613
48 hour	3		.0617
24 hour	3		.0630
72 hour	3		.0640
96 hour	3		.0653
Sig.		1.000	.177
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
24 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
48 hour	3	.0270	.04677	.02700	-.0892	.1432	.00	.08
72 hour	3	.1120	.00100	.00058	.1095	.1145	.11	.11
96 hour	3	.1093	.00153	.00088	.1055	.1131	.11	.11
120 hour	3	.1173	.01041	.00601	.0915	.1432	.11	.13
144 hour	3	.1127	.00153	.00088	.1089	.1165	.11	.11
Total	21	.0683	.05550	.01211	.0431	.0936	.00	.13

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.057	6	.010	28.903	.000
Within Groups	.005	14	.000		
Total	.062	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
		Subset for alpha = 0.05	
butanol	N	1	2
0 hour	3	.0000	
24 hour	3	.0000	
48 hour	3	.0270	
96 hour	3		.1093
72 hour	3		.1120
144 hour	3		.1127
120 hour	3		.1173
Sig.		.104	.626
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
24 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
48 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
72 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
96 hour	3	.0450	.00200	.00115	.0400	.0500	.04	.05
120 hour	3	.0123	.00058	.00033	.0109	.0138	.01	.01
144 hour	3	.0070	.00520	.00300	-.0059	.0199	.00	.01
Total	21	.0092	.01576	.00344	.0020	.0164	.00	.05

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	6	.001	182.617	.000
Within Groups	.000	14	.000		
Total	.005	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร					
Duncan[a]					
		Subset for alpha = 0.05			
Ethanol	N	1	2	3	4
0 hour	3	.0000			
24 hour	3	.0000			
48 hour	3	.0000			
72 hour	3	.0000			
144 hour	3		.0070		
120 hour	3			.0123	
96 hour	3				.0450
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
24 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
48 hour	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
72 hour	3	.3333	.01779	.01027	.2892	.3775	.31	.35
96 hour	3	.0450	.00200	.00115	.0400	.0500	.04	.05
120 hour	3	.0123	.00058	.00033	.0109	.0138	.01	.01
144 hour	3	.0070	.00520	.00300	-.0059	.0199	.00	.01
Total	21	.0568	.11682	.02549	.0036	.1100	.00	.35

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.272	6	.045	913.550	.000
Within Groups	.001	14	.000		
Total	.273	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Ethanol	N	1	2	3
0 hour	3	.0000		
24 hour	3	.0000		
48 hour	3	.0000		
144 hour	3	.0070		
120 hour	3	.0123		
96 hour	3		.0450	
72 hour	3			.3333
Sig.		.071	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ **ข.22** การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0127	.00115	.00067	.0098	.0155	.01	.01
24 hour	3	.0170	.00436	.00252	.0062	.0278	.01	.02
48 hour	3	.0167	.00289	.00167	.0095	.0238	.02	.02
72 hour	3	.0190	.00000	.00000	.0190	.0190	.02	.02
96 hour	3	.0203	.00058	.00033	.0189	.0218	.02	.02
120 hour	3	.0200	.00000	.00000	.0200	.0200	.02	.02
144 hour	3	.0203	.00058	.00033	.0189	.0218	.02	.02
Total	21	.0180	.00316	.00069	.0166	.0194	.01	.02

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	6	.000	5.621	.004
Within Groups	.000	14	.000		
Total	.000	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
Propanediol	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0 hour	3	.0127	
48 hour	3		.0167
24 hour	3		.0170
72 hour	3		.0190
120 hour	3		.0200
96 hour	3		.0203
144 hour	3		.0203
Sig.		1.000	.069
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0127	.00115	.00067	.0098	.0155	.01	.01
24 hour	3	.0170	.00436	.00252	.0062	.0278	.01	.02
48 hour	3	.0167	.00289	.00167	.0095	.0238	.02	.02
72 hour	3	.0190	.00000	.00000	.0190	.0190	.02	.02
96 hour	3	.0203	.00058	.00033	.0189	.0218	.02	.02
120 hour	3	.0200	.00000	.00000	.0200	.0200	.02	.02
144 hour	3	.0203	.00058	.00033	.0189	.0218	.02	.02
Total	21	.0180	.00316	.00069	.0166	.0194	.01	.02

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	6	.000	5.621	.004
Within Groups	.000	14	.000		
Total	.000	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
Propanediol	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0 hour	3	.0127	
48 hour	3		.0167
24 hour	3		.0170
72 hour	3		.0190
120 hour	3		.0200
96 hour	3		.0203
144 hour	3		.0203
Sig.		1.000	.069
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0340	.00000	.00000	.0340	.0340	.03	.03
24 hour	3	.0287	.00058	.00033	.0272	.0301	.03	.03
48 hour	3	.0277	.00058	.00033	.0262	.0291	.03	.03
72 hour	3	.0277	.00058	.00033	.0262	.0291	.03	.03
96 hour	3	.0273	.00058	.00033	.0259	.0288	.03	.03
120 hour	3	.0280	.00000	.00000	.0280	.0280	.03	.03
144 hour	3	.0267	.00058	.00033	.0252	.0281	.03	.03
Total	21	.0286	.00238	.00052	.0275	.0297	.03	.03

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	6	.000	76.867	.000
Within Groups	.000	14	.000		
Total	.000	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร					
Duncan[a]					
Propanediol	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
144 hour	3	.0267			
96 hour	3	.0273	.0273		
48 hour	3		.0277		
72 hour	3		.0277		
120 hour	3		.0280	.0280	
24 hour	3			.0287	
0 hour	3				.0340
Sig.		.116	.144	.116	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.0320	.00000	.00000	.0320	.0320	.03	.03
24 hour	3	.0313	.00115	.00067	.0285	.0342	.03	.03
48 hour	3	.0233	.00058	.00033	.0219	.0248	.02	.02
72 hour	3	.0220	.00100	.00058	.0195	.0245	.02	.02
96 hour	3	.0220	.00000	.00000	.0220	.0220	.02	.02
120 hour	3	.0213	.00058	.00033	.0199	.0228	.02	.02
144 hour	3	.0217	.00058	.00033	.0202	.0231	.02	.02
Total	21	.0248	.00452	.00099	.0228	.0269	.02	.03

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	6	.000	140.900	.000
Within Groups	.000	14	.000		
Total	.000	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
Propanediol	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
120 hour	3	.0213		
144 hour	3	.0217		
72 hour	3	.0220		
96 hour	3	.0220		
48 hour	3		.0233	
24 hour	3			.0313
0 hour	3			.0320
Sig.		.293	1.000	.256
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.6610	.00755	.00436	.6422	.6798	.65	.67
24 hour	3	.3143	.28984	.16734	-.4057	1.0343	.15	.65
48 hour	3	.0737	.07217	.04167	-.1056	.2529	.03	.16
72 hour	3	.0387	.00058	.00033	.0372	.0401	.04	.04
96hour	3	.0387	.00058	.00033	.0372	.0401	.04	.04
120 hour	3	.0390	.00000	.00000	.0390	.0390	.04	.04
144 hour	3	.0383	.00208	.00120	.0332	.0435	.04	.04
Total	21	.1720	.24485	.05343	.0605	.2834	.03	.67

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.020	6	.170	13.336	.000
Within Groups	.179	14	.013		
Total	1.199	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Galactose	N	1	2	3
144 hour	3	.0383		
72 hour	3	.0387		
96hour	3	.0387		
120 hour	3	.0390		
48 hour	3	.0737		
24 hour	3		.3143	
0 hour	3			.6610
Sig.		.733	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.27 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	.6610	.00755	.00436	.6422	.6798	.65	.67
24 hour	3	.3143	.28984	.16734	-.4057	1.0343	.15	.65
48 hour	3	.0737	.07217	.04167	-.1056	.2529	.03	.16
72 hour	3	.0387	.00058	.00033	.0372	.0401	.04	.04
96hour	3	.0387	.00058	.00033	.0372	.0401	.04	.04
120 hour	3	.0390	.00000	.00000	.0390	.0390	.04	.04
144 hour	3	.0383	.00208	.00120	.0332	.0435	.04	.04
Total	21	.1720	.24485	.05343	.0605	.2834	.03	.67

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.020	6	.170	13.336	.000
Within Groups	.179	14	.013		
Total	1.199	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร				
Duncan[a]				
		Subset for alpha = 0.05		
Galactose	N	1	2	3
144 hour	3	.0383		
72 hour	3	.0387		
96hour	3	.0387		
120 hour	3	.0390		
48 hour	3	.0737		
24 hour	3		.3143	
0 hour	3			.6610
Sig.		.733	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	1.6617	.04283	.02473	1.5553	1.7681	1.63	1.71
24 hour	3	.2747	.00321	.00186	.2667	.2827	.27	.28
48 hour	3	.2763	.00153	.00088	.2725	.2801	.28	.28
72 hour	3	.2760	.00200	.00115	.2710	.2810	.27	.28
96hour	3	.2767	.00153	.00088	.2729	.2805	.28	.28
120 hour	3	.2790	.00100	.00058	.2765	.2815	.28	.28
144 hour	3	.2820	.00100	.00058	.2795	.2845	.28	.28
Total	21	.4752	.49653	.10835	.2492	.7012	.27	1.71

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.927	6	.821	3098.276	.000
Within Groups	.004	14	.000		
Total	4.931	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
		Subset for alpha = 0.05	
Galactose	N	1	2
24 hour	3	.2747	
72 hour	3	.2760	
48 hour	3	.2763	
96hour	3	.2767	
120 hour	3	.2790	
144 hour	3	.2820	
0 hour	3		1.6617
Sig.		.626	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hour	3	3.2727	2.83475	1.63664	-3.7692	10.3146	.00	4.96
24 hour	3	4.6933	.24561	.14180	4.0832	5.3035	4.41	4.87
48 hour	3	2.4070	.29846	.17231	1.6656	3.1484	2.22	2.75
72 hour	3	1.7803	.13838	.07990	1.4366	2.1241	1.70	1.94
96hour	3	1.7533	.05774	.03334	1.6099	1.8968	1.72	1.82
120 hour	3	1.5900	.20377	.11764	1.0838	2.0962	1.37	1.77
144 hour	3	1.6790	.03064	.01769	1.6029	1.7551	1.66	1.71
Total	21	2.4537	1.42192	.31029	1.8064	3.1009	.00	4.96

ANOVA					
กรัมต่อลิตร					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.937	6	3.989	3.385	.028
Within Groups	16.500	14	1.179		
Total	40.437	20			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กรัมต่อลิตร			
Duncan[a]			
		Subset for alpha = 0.05	
Galactose	N	1	2
120 hour	3	1.5900	
144 hour	3	1.6790	
96hour	3	1.7533	
72 hour	3	1.7803	
48 hour	3	2.4070	
0 hour	3	3.2727	3.2727
24 hour	3		4.6933
Sig.		.110	.131
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. *Clostridium beijerinckii*

ตารางที่ ข.29 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_0 hr.	3	1.96E+06	5.57E+04	3.21E+04	1.82E+06	2.10E+06	1.9E+06	2.0E+06
growth_24 hr.	3	8.38E+06	2.07E+05	1.19E+05	7.87E+06	8.89E+06	8.2E+06	8.6E+06
growth_48 hr.	3	9.26E+05	2.08E+03	1.20E+03	9.20E+05	9.31E+05	9.2E+05	9.3E+05
growth_72 hr.	3	9.10E+04	7.23E+02	4.18E+02	8.92E+04	9.28E+04	9.0E+04	9.2E+04
growth_96 hr.	3	6.90E+04	2.00E+03	1.16E+03	6.41E+04	7.40E+04	6.7E+04	7.1E+04
growth_120 hr.	3	4.58E+04	7.23E+02	4.18E+02	4.40E+04	4.76E+04	4.5E+04	4.6E+04
growth_144 hr.	3	1.31E+04	8.72E+02	5.03E+02	1.09E+04	1.53E+04	1.3E+04	1.4E+04
growth_168 hr.	3	7.10E+03	9.50E+02	5.48E+02	4.74E+03	9.46E+03	6.5E+03	8.2E+03
Total	24	1.44E+06	2.76E+06	5.64E+05	2.70E+05	2.60E+06	6.5E+03	8.6E+06

ANOVA

cell (CFU/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.75E+14	7	2.50E+13	4373.041	0
Within Groups	9.16E+10	16	5.73E+09		
Total	1.75E+14	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

Time	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
growth_168 hr.	3	7.10E+03			
growth_144 hr.	3	1.31E+04			
growth_120 hr.	3	4.58E+04			
growth_96 hr.	3	6.90E+04			
growth_72 hr.	3	9.10E+04			
growth_48 hr.	3		9.26E+05		
growth_0 hr.	3			1.96E+06	
growth_24 hr.	3				8.38E+06
Sig.		0.236903834	1	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.30 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหารP2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_0 hr.	3	2.07E+06	8.55E+04	4.94E+04	1.86E+06	2.28E+06	2.00E+06	2.10E+06
growth_24 hr.	3	3.93E+06	3.73E+05	2.16E+05	3.00E+06	4.85E+06	3.50E+06	4.20E+06
growth_48 hr.	3	2.45E+05	2.10E+04	1.21E+04	1.93E+05	2.97E+05	2.30E+05	2.70E+05
growth_72 hr.	3	3.82E+04	3.97E+03	2.29E+03	2.83E+04	4.80E+04	3.40E+04	4.20E+04
growth_96 hr.	3	3.31E+03	1.87E+02	1.08E+02	2.84E+03	3.78E+03	3.10E+03	3.50E+03
growth_120 hr.	3	3.90E+02	7.00E+01	4.04E+01	2.16E+02	5.64E+02	3.20E+02	4.60E+02
growth_144 hr.	3	9.33E+01	2.52E+01	1.45E+01	3.08E+01	1.56E+02	7.00E+01	1.20E+02
growth_168 hr.	3	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Total	24	7.86E+05	1.40E+06	2.85E+05	1.96E+05	1.37E+06	0.00E+00	4.20E+06

ANOVA

cell (CFU/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.45E+13	7	6.36E+12	345.444	0
Within Groups	2.94E+11	16	1.84E+10		
Total	4.48E+13	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

growth_hr	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
growth_168 hr.	3	0.00E+00		
growth_144 hr.	3	9.33E+01		
growth_120 hr.	3	3.90E+02		
growth_96 hr.	3	3.31E+03		
growth_72 hr.	3	3.82E+04		
growth_48 hr.	3	2.45E+05		
growth_0 hr.	3		2.07E+06	
growth_24 hr.	3			3.93E+06
Sig.		0.0651393	1	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.31 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหารP2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_0 hr.	3	2.09E+06	1.19E+05	6.85E+04	1.79E+06	2.38E+06	2.00E+06	2.22E+06
growth_24 hr.	3	2.76E+06	1.35E+05	7.82E+04	2.43E+06	3.10E+06	2.61E+06	2.87E+06
growth_48 hr.	3	2.80E+06	2.29E+05	1.32E+05	2.23E+06	3.37E+06	2.54E+06	2.99E+06
growth_72 hr.	3	3.67E+06	5.51E+05	3.18E+05	2.30E+06	5.03E+06	3.30E+06	4.30E+06
growth_96 hr.	2	3.51E+06	1.01E+05	7.12E+04	2.61E+06	4.42E+06	3.44E+06	3.58E+06
growth_120 hr.	3	3.97E+06	5.17E+04	2.99E+04	3.85E+06	4.10E+06	3.92E+06	4.01E+06
growth_144 hr.	3	3.77E+06	2.36E+05	1.36E+05	3.19E+06	4.36E+06	3.57E+06	4.03E+06
growth_168 hr.	3	4.78E+06	2.55E+05	1.47E+05	4.15E+06	5.41E+06	4.50E+06	5.01E+06
growth_192 hr.	2	2.04E+05	6.01E+03	4.25E+03	1.50E+05	2.58E+05	2.00E+05	2.09E+05
growth_216 hr.	3	2.43E+05	5.12E+03	2.95E+03	2.31E+05	2.56E+05	2.38E+05	2.48E+05
growth_240 hr.	3	3.25E+04	2.64E+03	1.52E+03	2.59E+04	3.90E+04	3.03E+04	3.54E+04
growth_264 hr.	3	4.08E+04	6.90E+02	3.98E+02	3.90E+04	4.25E+04	4.03E+04	4.15E+04

ตารางที่ ข.31 (ต่อ) การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหารP2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_288 hr.	3	3.73E+04	3.40E+03	1.97E+03	2.89E+04	4.58E+04	3.54E+04	4.13E+04
growth_312 hr.	3	2.15E+04	2.08E+03	1.20E+03	1.63E+04	2.67E+04	1.97E+04	2.38E+04
growth_336 hr.	3	2.03E+04	4.55E+02	2.63E+02	1.92E+04	2.15E+04	2.01E+04	2.09E+04
growth_360 hr.	3	3.24E+03	2.43E+02	1.41E+02	2.63E+03	3.84E+03	3.02E+03	3.50E+03
Total	46	1.74E+06	1.79E+06	2.64E+05	1.21E+06	2.28E+06	3.02E+03	5.01E+06

ANOVA

cell (CFU/ml)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.44E+14	15	9.58E+12	277.976	0
Within Groups	1.03E+12	30	3.45E+10		
Total	1.45E+14	45			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
growth_360	3	3.24E+03					
growth_336	3	2.03E+04					
growth_312	3	2.15E+04					
growth_240	3	3.25E+04					
growth_288	3	3.73E+04					
growth_264	3	4.08E+04					
growth_192	2	2.04E+05					
growth_216	3	2.43E+05					
growth_0	3		2.09E+06				
growth_24	3			2.76E+06			
growth_48	3			2.80E+06			
growth_96	2				3.51E+06		
growth_72	3				3.67E+06	3.67E+06	
growth_144	3				3.77E+06	3.77E+06	
growth_120	3					3.97E+06	
growth_168	3						4.78E+06
Sig.		0.1955745	1	0.8149716	0.1236666	0.0716468	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.32 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

Glucose (g/L)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hr.	3	60.7509	0.5595	0.3230	59.3610	62.1408	60.1536	61.2628
24 hr.	3	37.0876	1.2579	0.7262	33.9629	40.2123	35.6655	38.0546
48 hr.	3	33.1627	0.9437	0.5449	30.8184	35.5070	32.1672	34.0444
72 hr.	3	29.1809	0.3719	0.2147	28.2570	30.1048	28.9249	29.6075
96 hr.	3	25.5973	1.1158	0.6442	22.8256	28.3690	24.8294	26.8771
120 hr.	3	20.6769	1.7242	0.9954	16.3938	24.9600	19.1126	22.5256
144 hr.	3	21.2457	0.8403	0.4852	19.1582	23.3333	20.5631	22.1843
168 hr.	3	20.3072	1.3136	0.7584	17.0441	23.5702	19.1980	21.7577
Total	24	31.0011	12.9301	2.6394	25.5412	36.4611	19.1126	61.2628

ANOVA

Glucose (g/L)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3826.190	7.000	546.599	456.760	0.000
Within Groups	19.147	16.000	1.197		
Total	3845.337	23.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

glucose (g/l)

Duncan[a]

Time	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
168 hr.	3	20.3072					
120 hr.	3	20.6769					
144 hr.	3	21.2457					
96 hr.	3		25.5973				
72 hr.	3			29.1809			
48 hr.	3				33.1627		
24 hr.	3					37.0876	
0 hr.	3						60.7509
Sig.		0.334	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.33 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

Glucose (g/L)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0 hr.	3	24.5449	1.2137	0.7007	21.5300	27.5599	23.72	25.94
24 hr.	3	0.2708	0.0245	0.0142	0.2098	0.3317	0.24	0.29
48 hr.	3	0.2452	0.0069	0.0040	0.2279	0.2624	0.24	0.25
72 hr.	3	0.2258	0.0077	0.0045	0.2066	0.2451	0.22	0.23
96 hr.	3	0.2150	0.0081	0.0047	0.1948	0.2352	0.21	0.22
120 hr.	3	0.1860	0.0017	0.0010	0.1818	0.1902	0.18	0.19
144 hr.	3	0.2002	0.0034	0.0020	0.1917	0.2088	0.20	0.20
168 hr.	3	0.2002	0.0089	0.0051	0.1782	0.2223	0.19	0.21
Total	24	3.2610	8.2254	1.6790	-0.2123	6.7343	0.18	25.94

ANOVA

Glucose (g/L)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1553.176	7.000	221.882	1204.326	0.000
Within Groups	2.948	16.000	0.184		
Total	1556.124	23.000			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

glucose (g/l)

Duncan[a]

Time	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
168	3	0.1860	
120	3	0.2002	
144	3	0.2002	
96	3	0.2150	
72	3	0.2258	
48	3	0.2452	
24	3	0.2708	
0	3		24.5449
Sig.		0.832	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.34 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

glycerol (g/l)

Time	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
growth_0 hr.	3	7.1245	0.10983	0.06341	6.8517	7.3974	7	7.21
growth_24 hr.	3	7.3947	0.31415	0.18138	6.6143	8.1751	7.09	7.72
growth_48 hr.	3	6.9036	0.70758	0.40852	5.1459	8.6613	6.16	7.57
growth_72 hr.	3	6.8377	0.4643	0.26806	5.6843	7.9911	6.3	7.13
growth_96 hr.	3	5.9676	0.13301	0.07679	5.6372	6.298	5.82	6.09
growth_120 hr.	3	5.9207	0.07981	0.04608	5.7224	6.1189	5.83	5.98
growth_144 hr.	3	4.845	0.71577	0.41325	3.0669	6.6231	4.23	5.63
growth_168 hr.	3	13.7571	6.07844	3.50939	-1.3426	28.8567	6.77	17.81
growth_192 hr.	3	4.6434	0.40889	0.23607	3.6277	5.6591	4.38	5.11
growth_216 hr.	3	4.187	0.86893	0.50168	2.0284	6.3455	3.25	4.97
growth_240 hr.	3	3.2928	0.30786	0.17774	2.5281	4.0576	2.95	3.55
growth_264 hr.	3	2.6401	0.34503	0.1992	1.783	3.4972	2.26	2.94
growth_288 hr.	3	2.9958	0.97063	0.5604	0.5846	5.407	2.38	4.11
growth_312 hr.	3	3.5084	0.8613	0.49727	1.3689	5.648	2.59	4.3
growth_336 hr.	3	0.9356	1.62047	0.93558	-3.0899	4.9611	0	2.81
growth_360 hr.	3	0	0	0	0	0	0	0
Total	48	5.0596	3.40735	0.49181	4.0702	6.049	0	17.81

ANOVA

glycerol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	458.157	15	30.544	11.169	.000
Within Groups	87.514	32	2.735		
Total	545.671	47			

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Glycerol (g/l)

Duncan[a]

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
360	3	.0000						
336	3	.9356	.9356					
264	3	2.6401	2.6401	2.6401				
288	3		2.9958	2.9958	2.9958			
240	3		3.2928	3.2928	3.2928			
312	3		3.5084	3.5084	3.5084			
216	3			4.1870	4.1870	4.1870		
192	3			4.6434	4.6434	4.6434	4.6434	
144	3			4.8450	4.8450	4.8450	4.8450	
120	3				5.9207	5.9207	5.9207	
96	3				5.9676	5.9676	5.9676	
72	3					6.8377	6.8377	
48	3					6.9036	6.9036	
0	3					7.1245	7.1245	
24	3						7.3947	
168	3							13.7571
Sig.		.073	.097	.166	.066	.069	.088	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.35 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
butanol	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	48	3	5.6100	.54745	.31607	4.2501	6.9699	4.98	5.97
	72	3	7.5533	.39577	.22850	6.5702	8.5365	7.31	8.01
	96	3	7.3767	.21595	.12468	6.8402	7.9131	7.15	7.58
	120	3	8.1167	.64856	.37445	6.5055	9.7278	7.37	8.54
	144	3	7.9433	.63011	.36379	6.3781	9.5086	7.44	8.65
	168	3	7.8967	.31501	.18187	7.1141	8.6792	7.58	8.21
	Total	24	5.5621	3.38269	.69049	4.1337	6.9905	.00	8.65
acetone	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	48	3	1.0727	.22830	.13181	.5055	1.6398	.83	1.28
	72	3	1.5900	.16462	.09504	1.1811	1.9989	1.40	1.69

ตารางที่ ข.35 (ต่อ) การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
96	3	1.5767	.04041	.02333	1.4763	1.6771	1.54	1.62
120	3	1.6300	.08544	.04933	1.4178	1.8422	1.54	1.71
144	3	1.3700	.12767	.07371	1.0528	1.6872	1.26	1.51
168	3	1.6500	.15133	.08737	1.2741	2.0259	1.48	1.77
Total	24	1.1112	.68793	.14042	.8207	1.4017	.00	1.77

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
butanol	Between Groups	260.340	7	37.191	209.549	.000
	Within Groups	2.840	16	.177		
	Total	263.180	23			
acetone	Between Groups	10.630	7	1.519	95.392	.000
	Within Groups	.255	16	.016		
	Total	10.885	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

butanol

Duncan[a]

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	.0000		
24	3	.0000		
48	3		5.6100	
96	3			7.3767
72	3			7.5533
168	3			7.8967
144	3			7.9433
120	3			8.1167
Sig.		1.000	1.000	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acetone

Duncan[a]

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.0000			
24	3	.0000			
48	3		1.0727		
144	3			1.3700	
96	3			1.5767	1.5767
72	3			1.5900	1.5900
120	3				1.6300
168	3				1.6500
Sig.		1.000	1.000	.059	.522

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.36 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
butanol	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	4.4500	.19698	.11372	3.9607	4.9393	4.23	4.61
	48	3	4.3867	.23438	.13532	3.8044	4.9689	4.12	4.56
	72	3	4.5967	.11372	.06566	4.3142	4.8792	4.47	4.69
	96	3	4.5867	.24542	.14170	3.9770	5.1963	4.44	4.87
	120	3	4.3733	.14189	.08192	4.0209	4.7258	4.22	4.50
	144	3	4.7033	.20257	.11695	4.2001	5.2065	4.54	4.93
	168	3	4.5033	.21779	.12574	3.9623	5.0444	4.26	4.68
	Total	24	3.9500	1.53665	.31367	3.3011	4.5989	.00	4.93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.36 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
acetone	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.7920	.10886	.06285	.5216	1.0624	.67	.87
	48	3	.5913	.17885	.10326	.1471	1.0356	.39	.70
	72	3	.7310	.04084	.02358	.6295	.8325	.70	.78
	96	3	.6673	.08394	.04846	.4588	.8759	.61	.76
	120	3	.6373	.07401	.04273	.4535	.8212	.56	.71
	144	3	.7927	.09438	.05449	.5582	1.0271	.71	.90
	168	3	.7210	.04857	.02804	.6003	.8417	.67	.77
	Total	24	.6166	.25938	.05295	.5071	.7261	.00	.90

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
butanol	Between Groups	53.759	7	7.680	223.008	.000
	Within Groups	.551	16	.034		
	Total	54.310	23			
acetone	Between Groups	1.409	7	.201	23.234	.000
	Within Groups	.139	16	.009		
	Total	1.547	23			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

butanol

Duncan[a]

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	.0000	
120	3		4.3733
48	3		4.3867
24	3		4.4500
168	3		4.5033
96	3		4.5867
72	3		4.5967
144	3		4.7033
Sig.		1.000	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

acetone

Duncan[a]

เวลา	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	.0000		
48	3		.5913	
120	3		.6373	.6373
96	3		.6673	.6673
168	3		.7210	.7210
72	3		.7310	.7310
24	3			.7920
144	3			.7927
Sig.		1.000	.115	.086

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้