

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน
ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Biological Production of Butanol from Glycerol

นางสาววรรักษ์ สงวนไชยไผ่วงศ์

RCH

TP

248

.B8

ว 233 ก

ด.1

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 120209
วัน,เดือน,ปี- 9 ก.พ. 2555

b. 120240329
i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

| | |
|--------------------|--|
| ชื่อโครงการ | 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, <i>Clostridium beijerinckii</i> , <i>Clostridium acetobutyricum</i> , การหมักในสภาวะไร้อากาศ |

บทคัดย่อ

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

สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่นำมาทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร) เมื่อทำการศึกษากการเจริญเติบโต จะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 พบเป็นจำนวน 1.33×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่จะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร

ได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอล ได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลอง ไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

| | | | |
|------------------------|---|------------------------|--------------|
| 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 1 st October 2009 to 30 th 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, <i>Clostridium beijerinckii</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , 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 beijerinckii* 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)

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 4.80×10^9 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, butanol 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 beijerinckii TISR 1390 was cultivated for the production of butanol. 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 8.33×10^6 CFU/ml at 24 hours of the cultivation, while the maximum growth of microorganism (3.93×10^6 CFU/ml) was presented at 24 hours with the addition of 20 g/l glucose. The addition of 20 g/l glycerol provided 4.78×10^6 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

maximum butanol 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.

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 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิต บิวทานอล | 14 |
| 2.3 ก्लीเซอรอล (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 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| 2.4.6 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล | 25 |
| 2.4 กระบวนการหมักอะซิโตน-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 <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 37 |
| 2.5.2 <i>Clostridium beijerinckii</i> | 38 |
| 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล | 39 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 47 |
| 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ | |
| 3.1.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 47 |
| 3.1.2 <i>Clostridium beijerinckii</i> | 47 |
| 3.2 สารเคมี | 47 |
| 3.3 อุปกรณ์ | 47 |
| 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ | 48 |
| 3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial | 48 |
| 3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> สูตรที่ 1 | 49 |
| 3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> สูตรที่ 2 | 49 |
| 3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> | 50 |
| 3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ | 51 |
| 3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 51 |
| 3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> | 51 |
| 3.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ | 52 |
| 3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารสูตรที่ 1 | 52 |
| 3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารสูตรที่ 2 ในระดับพลาสติก | 52 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| 3.6.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ไม่ใช้ไบพัด | 52 |
| 3.6.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ไบพัด | 53 |
| 3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> | 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 <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1 | 56 |
| 4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มี กลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม | 56 |
| 4.1.2 การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสม เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ | 61 |
| 4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2 | 64 |
| 4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในพลาสติก | 64 |
| 4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ไบพัด | 68 |
| 4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ไบพัด | 74 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| 4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 | 80 |
| 4.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม | 80 |
| 4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> ในอาหาร ที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส | 84 |
| บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ | 93 |
| เอกสารอ้างอิง | 97 |
| ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน | 106 |
| ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ | 116 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า | |
|----------|--|----|
| 2.1 | คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล | 7 |
| 2.2 | ชื่อเรียกและสูตร โมเลกุลของบิวทานอล | 7 |
| 2.3 | คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊ส โซลีน 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 <i>Clostridium acetobutylicum</i> และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 58 |
| 4.2 | ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 59 |
| 4.3 | ปริมาณเมทานอลที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ | 61 |
| 4.4 | ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> เมื่อเวลาผ่านไป | 62 |
| 4.5 | ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง | 62 |
| 4.6 | การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง | 65 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.7 | 67 |
| การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง | |
| 4.8 | 69 |
| การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ไบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |
| 4.9 | 72 |
| การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ไบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |
| 4.10 | 74 |
| ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i> TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ไบพัด และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |
| 4.11 | 75 |
| การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ไบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |
| 4.12 | 76 |
| ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i> TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อ เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ไบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |
| 4.13 | 78 |
| การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถัง หมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ไบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| 4.14 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส | 79 |
| 4.15 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มี กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคส ที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 81 |
| 4.16 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ หมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อ ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตาม เวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 83 |
| 4.17 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มี กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่ เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 85 |
| 4.18 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยง เชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 87 |
| 4.19 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ หมักของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อ ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตาม เวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 89 |
| 4.20 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ หมักของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัม ต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง | 90 |
| ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใน การเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์ | 106 |
| ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใน การเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร | 107 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล | 116 |
| ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคส | 119 |
| ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร | 121 |
| ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร | 123 |
| ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร | 125 |
| ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร | 127 |
| ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง | 129 |
| ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง | 131 |
| ข.9 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด | 133 |
| ข.10 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด | 135 |
| ข.11 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 137 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| ข.12 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 139 |
| ข.13 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง | 141 |
| ข.14 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบโพด | 143 |
| ข.15 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 145 |
| ข.16 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบโพด | 147 |
| ข.17 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 149 |
| ข.18 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบโพด | 151 |
| ข.19 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 153 |
| ข.20 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบโพด | 155 |
| ข.21 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 157 |
| ข.22 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบโพด | 159 |
| ข.23 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 161 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|--|------|
| ข.24 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด | 163 |
| ข.25 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 165 |
| ข.26 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด | 167 |
| ข.27 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 169 |
| ข.28 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด | 171 |
| ข.29 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที | 173 |
| ข.30 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร | 175 |
| ข.31 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร | 177 |
| ข.32 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร | 179 |
| ข.33 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือนตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร | 182 |
| ข.34 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือนตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร | 184 |
| ข.35 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือนตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร | 186 |
| ข.36 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร | 188 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| ข.37 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร | 191 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1.1 | วิธีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ <i>Clostridium beijerinckii</i> | 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 | วิธีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย <i>C. oxydans</i> ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตออกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate | 28 |
| 2.10 | ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล | 29 |
| 2.11 | ลักษณะของ <i>C. beijerinckii</i> JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า | 31 |
| 2.12 | ลักษณะสปอร์ของ <i>C. beijerinckii</i> JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า | 31 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| <p>2.13 วิธีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ <i>C. acetobutylicum</i> ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ดังนี้: 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 แทนอะซีโตอะซีเตท 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)</p> | 34 |
| 2.14 ภาพของ <i>Clostridium acetobutylicum</i> | 37 |
| 2.15 ลักษณะของ <i>Clostridium beijerinckii</i> เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน | 38 |
| 2.16 วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ <i>Clostridium acetobutylicum</i> เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์ และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับจำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC | 41 |
| 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> และปริมาณแหล่งอาหารที่เหลืออยู่ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ก) ในอาหารซูดควบคุมที่มีกลูโคสและ (ข) ในอาหารที่มีกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ | 57 |
| 4.2 ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> สูงสุด ที่ 120 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และที่ 144 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร | 63 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงใน ฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส) | 65 |
| 4.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล) | 66 |
| 4.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส) | 69 |
| 4.6 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และโพรเวต ซึ่งการใช้โพรเวตจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทีเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม | 71 |
| 4.7 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล) | 72 |
| 4.8 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด | 73 |
| 4.9 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด | 76 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า | |
|--------|--|----|
| 4.10 | จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> และปริมาณ กลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณ กลีเซอรอล) | 77 |
| 4.11 | ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด | 79 |
| 4.12 | การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาล กลูโคสของเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 (■) ในอาหารอุดม P2 | 82 |
| 4.13 | ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (×) อะซีโตน (—) 1,3-โพรเพนไดออล (●) และค่าความเป็นกรดต่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เพียงอย่างเดียว | 84 |
| 4.14 | การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร | 86 |
| 4.15 | การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้ กลีเซอรอลของเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 (■) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร | 88 |
| 4.16 | ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (×) อะซีโตน (—) 1,3-โพรเพนไดออล (●) และค่าความเป็นกรดต่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เพียงอย่างเดียว | 90 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 4.17 | ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (-*-*) 1,3 โพรเพนไดออล (-+*) และค่าความเป็นกรดต่าง (-*-*) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C beijerinckii</i> TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน | 92 |
| ก.1 | กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบพลาสติก | 107 |
| ก.2 | กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร | 108 |
| ก.3 | กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ <i>Clostridium beijerinckii</i> | 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 | กราฟมาตรฐานของกรดไพรพาโอนิกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 111 |
| ก.9 | กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 111 |
| ก.10 | กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 112 |
| ก.11 | กราฟมาตรฐานของอะซีโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 112 |
| ก.12 | กราฟมาตรฐานของซอร์บิทอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC | 113 |
| ก.13 | โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ (ก) บิวทานอลมาตรฐาน (ข) ตัวอย่างที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> TISTR 1462 ด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง | 114 |

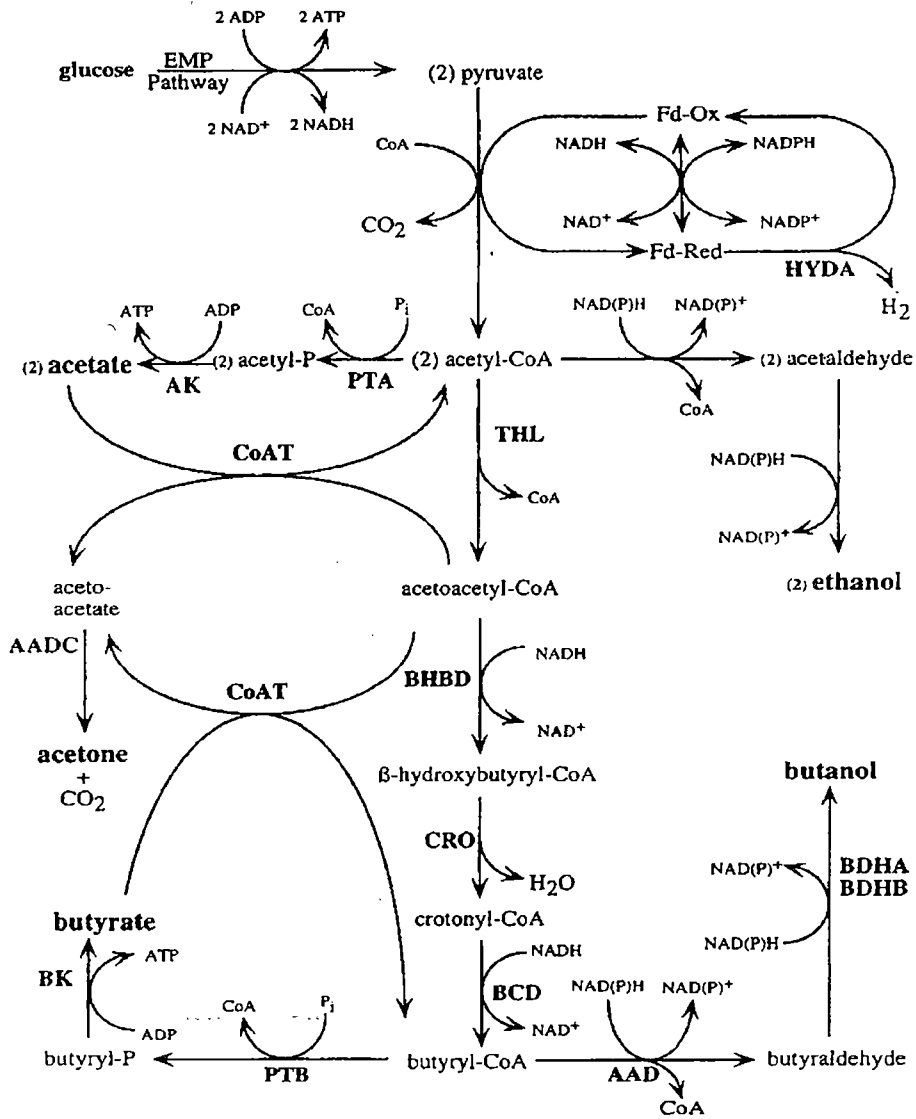
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

เนื่องจากภาวะการณปัจจุบันกำลังประสบปัญหาในเรื่องพลังงานเชื้อเพลิงที่มีการลดจำนวนลงตลอดจนปัญหาของราคาน้ำมันที่มีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ซึ่งได้ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงทำให้เกิดการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ และพลังงานทางเลือกที่จะใช้ทดแทนพลังงานประเภทใช้แล้วหมดไป เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน ก๊าซธรรมชาติ (พัฒนาและคณะ, 2549) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตพลังงานทางเลือกเพิ่มมากขึ้น อาทิ เช่น เอทานอล และบิวทานอล โดยกระบวนการหมัก เพื่อเป็นการตอบสนองการปรับตัวสูงของราคาแก๊สโซลีน และลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ (Qureshi และคณะ, 2007)

บิวทานอล หรือ บิวทิวแอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นคาร์บอน 4 อะตอม และมีสูตรโมเลกุลเป็น C_4H_9OH เป็นสารที่มีขั้วอ่อนๆจึงมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวต่ำ สามารถติดไฟได้ง่าย ทำให้เกิดการนำเอาบิวทานอลมาใช้เป็นผลิตเชื้อเพลิง บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งเป็นตัวป้อนสารเคมีที่ดีในอุตสาหกรรมพลาสติก เป็นตัวแยกระดับของอาหารในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมปรุงแต่งรส และที่สำคัญเป็นเชื้อเพลิงที่มีขั้วดีเมื่อเทียบกับ เอทานอล (Formanek และคณะ, 1997; Parekh และคณะ, 1998; Parekh และคณะ, 1999) บิวทานอลมีปริมาณออกซิเจนร้อยละ 22 จึงทำให้เชื้อเพลิงมีการเผาไหม้ดีกว่าเอทานอล และเป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนมากกว่าเอทานอล 2 เท่า ทำให้มีค่าพลังงานมากกว่า เอทานอล (ค่าพลังงานของบิวทานอลและเอทานอลเท่ากับ 110 และ 78 กิโลจูลต่อแกลลอนตามลำดับ) (<http://www.butanol.com>, 2010) การค้นพบบิวทานอลเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1861 โดย Pasteur ได้ทำการผลิตบิวทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ เป็นครั้งแรก ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Sehardinger ได้ค้นพบผลิตภัณฑ์ที่เกิดร่วมกับบิวทานอลในการหมัก คือ อะซิโตน ต่อมากระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลได้ถูกพัฒนาขึ้น เนื่องจากเกิดปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบิวทาไคอื่น ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตยางสังเคราะห์ (Jones และ Woods, 1986) แต่ในขณะปัจจุบัน ได้เกิดความสนใจในการค้นคว้าเชื้อเพลิงชีวภาพบิวทานอลเพิ่มมากขึ้น ที่สามารถผลิตโดยการใช้จุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย และโดยทั่วไปจะใช้สายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinckii*



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

กระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตบิวทานอลนั้นเกิดจากการนำเชื้อแบคทีเรียจีโนส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการผลิต โดยในการทำงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium berjerinckii* ในการผลิตบิวทานอล ซึ่งเชื้อสองสายพันธุ์นี้จะสามารถหมักแป้งและน้ำตาลได้บิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วงตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นแรกช่วงนี้ว่า Acidogenesis phase ซึ่งจะทำให้การผลิตกรดจำพวกกรดอะซีติกและกรดบิวทาริก และช่วงที่สองจะ

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

ในงานวิจัยนี้ต้องการทราบว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium berjerinckii* นั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้โดยการเติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำมาเปรียบเทียบกับ การเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว 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 ที่ซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จากนั้น ทำการมาทดลองหาเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลของเชื้อจากกลีเซอรอลในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยเปรียบเทียบกับกลูโคส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลได้ปริมาณมากจากการใช้กลีเซอรอลเป็นวัตถุดิบ
2. เป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเรื่องนี้ในขั้นต่อไป คือ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการขยายขนาดสู่การผลิตในระดับโรงงานต้นแบบต่อไป
3. เป็นการพัฒนานักวิจัยและเทคโนโลยีเพื่อให้รองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมด้านพลังงานไบโอดีเซลของประเทศในอนาคต
4. เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างรายได้ และลดการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศ

2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

ในปัจจุบันบิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ อีกทั้งยังใช้บิวทานอลในการเป็นตัวทำละลายที่ต้องการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล

นอกจากนี้บิวทานอลยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอม และในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นที่เชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้เชื้อเพลิงได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูง ปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ตัดแปลงเครื่องยนต์ 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 แต่มีแนวโน้มได้ผลดีกว่าการใช้ แอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ

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 |
| ความต้งจำเพาะ | 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](http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf)

(01/04/2554)

ตารางที่ 2.2 ชื่อเรียกและสูตร โมเลกุลของบิวทานอล

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

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

คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

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 ทั้งนี้ อัตราเพิ่มของค่าออกเทนจะลดลงเล็กน้อย เมื่อส่วนผสมเพิ่มมากกว่าร้อยละ 50 แสดงให้เห็นว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน (octane improver) แทนที่สารตะกั่วหรือสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) เป็นสารเคมีที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ผลิตขึ้นได้จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง Methanol และ Isobutane ได้ ซึ่งในอัตราส่วนร้อยละ 20 โดยปริมาตร จะทำให้น้ำมันเบนซินธรรมดาในท้องตลาดประเทศไทยมีค่าออกเทนประมาณ 91 ซึ่งเพียงพอกับเครื่องยนต์ส่วนใหญ่ที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย

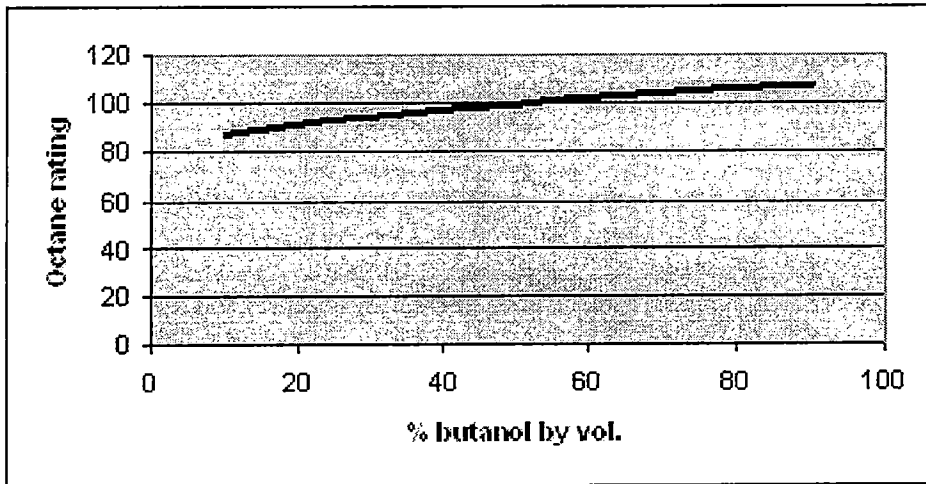
ค) ค่าซีเทน (cetane rating)

ส่วนค่าซีเทน (cetane rating) ซึ่งใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันดีเซล พบว่าบิวทานอลมีค่าซีเทนประมาณ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซล ซึ่งมีค่าประมาณ 48.8 จะเห็นว่าค่าซีเทนของบิวทานอลต่ำกว่ามาก จนมีความจำเป็นต้องเติมสารเพิ่มค่าซีเทน (cetane improver) เช่น ไอโซบิวทิวไนเตรต (isobutyl nitrate) พบว่า หากผสมน้ำมันดีเซลร้อยละ 75 เปอร์เซนต์ 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

เหมือนแอลกอฮอล์ตัวอื่น ดังจะเห็นได้จากค่าคุณสมบัติทางพลังงานที่ใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนมากกว่าแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ ตามที่แสดงในตารางที่ 2.3



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

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล

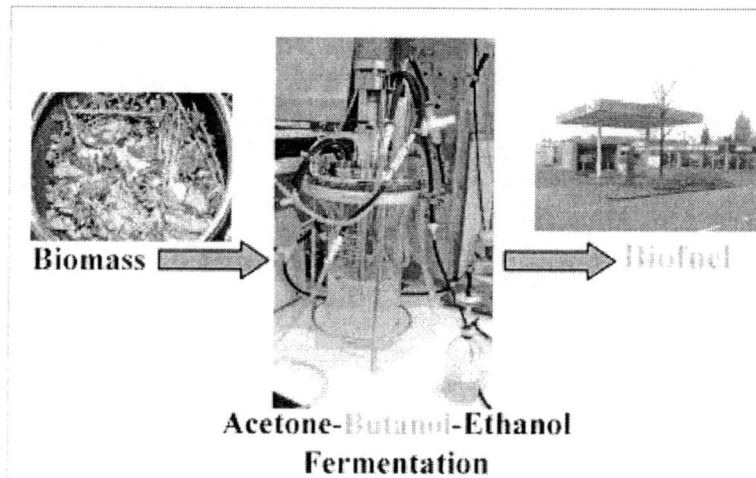
| คุณสมบัติทางพลังงาน ของน้ำมันรต บิวทานอล เอทานอล เมทานอล | Energy density (MJ/L) | Air- fuel ratio | Specific energy (MJ/kg air) | Heat of vaporization (MJ/kg) | RON | MON |
|--|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------|-------|
| 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)

2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล

บิวทานอลสามารถได้มาจากหลายวิธีคือกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน กระบวนการหมักจากมวลชีวภาพบางชนิด และ กระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมากคือ กระบวนการหมัก โดยใช้แบคทีเรียที่เหมาะสม ซึ่งในการหมัก มักจะเรียกว่ากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation) โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในจินัส *Clostridium* เช่น *Clostridium butyricum* และ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งเดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อ ผลิตอะซีโตน จากสารจำพวกแป้ง ซึ่งตอนนั้นบิวทานอลและเอทานอลเป็นผลพลอยได้ที่ได้ออกมาจากการหมัก ซึ่งบิวทานอลที่ได้นั้นมากพอสมควร

ในปัจจุบัน กระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล มีกระบวนการดังนี้คือ เมื่อสารตั้งต้น เช่น น้ำตาล ถูกหมักโดยแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* นั้นจะเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นบิวทานอล ซึ่งในกระบวนการนี้ แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ที่เปลี่ยนสารอาหารให้เป็นบิวทานอลจะตายไป ตามแผนภาพที่แสดงในรูป 2.3 เมื่อความเข้มข้นของบิวทานอลประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความพยายามที่จะค้นคว้าให้แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) ซึ่งใช้ในการหมักสามารถทนทานต่อบิวทานอลให้ได้มากขึ้น เพื่อให้ผลผลิตของบิวทานอลมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการศึกษาพบว่า บิวทานอลให้พลังงานได้สูงกว่าเอทานอลตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้พวกของเหลือจากการผลิตเอทานอลยังสามารถนำมาผลิตบิวทานอลต่อได้อีกด้วย (โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552)



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.org/wiki/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 กลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis)

ผลิตทางการค้า

กลูโคสสามารถผลิตเป็นการค้าได้โดยการ ไฮโดรไลซิสแป้ง ที่มี เอนไซม์ ช่วยเร่งปฏิกิริยา พืชผักมากมายสามารถใช้เป็นแหล่งของแป้งได้เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันเทศ มันสำปะหลัง (cassava) ตันไม้เท้าขยำมอม (arrowroot) และ สาquin การใช้แป้งจากพืชจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของโลก ในสหรัฐอเมริกาแป้งส่วนใหญ่จะเป็นแป้งข้าวโพด (จากต้นข้าวโพด) ในประเทศแถบเอเชียอย่างประเทศไทย จะใช้ข้าวทำแป้งเช่น แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว

กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนแรกใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง อุณหภูมิประมาณ 100 °C เอนไซม์ เหล่านี้จะ ไฮโดรไลซ์แป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรตที่เล็กลง โดยจะมีโมเลกุลของกลูโคส 5-10 หน่วย ความคิดเพียงของกระบวนการจะอยู่ที่การต้มส่วนผสมของแป้งที่อุณหภูมิ 130 °C หรือ ร้อนกว่านี้ หนึ่งครั้งหรือมากกว่า การใช้ความร้อนระดับนี้เพื่อช่วยการละลายของแป้งในน้ำแต่มันก็จะทำลายฤทธิ์เอนไซม์ ซึ่งจะต้องเติมเอนไซม์เข้าไปใหม่ในการต้มแต่ละครั้ง

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

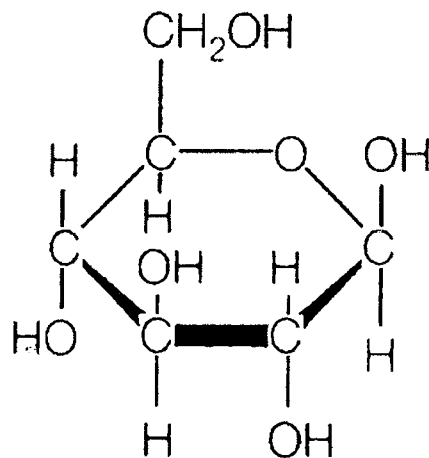
2.2.2 คุณสมบัติของกลูโคส

กลูโคสมีชื่อเรียกทางเคมีและคุณสมบัติตามตารางที่ 2.4 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูป 2.4

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 | เดกซ์โทรส(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)

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 แต่การเติมแอมโมเนียมมากเกินไป จะทำให้การหมักได้กรดมากกว่าตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า การจำกัดปริมาณแอมโมเนียม ก็จะต้องจำกัดปริมาณกลูโคสด้วย จึงเป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการสนับสนุนให้มีการสร้างตัวทำละลาย หรือกล่าวว่า ระดับความเข้มข้นของกลูโคสและแอมโมเนียมที่จะเปลี่ยนเป็นบิวทานอล ก็คือระดับความเข้มข้นของสับสเตรตที่จะเปลี่ยนเป็นระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั่นเอง

Pimpa และ Goma (1984) กล่าวว่า ในวิถีเมตาบอลิซึมของการสร้างบิวทานอลจากกลูโคส โดยไม่ผ่านกรดบิวทริกนั้น จะวิเคราะห์ได้ว่า ในบางครั้ง *Clostridium* สามารถสร้างบิวทานอลจากกลูโคสได้โดยตรง โดยไม่ผ่านกรดบิวทริก ซึ่งมีข้อเสียคือ นอกจากไม่มีการกำจัดกรดอะซิดิกแล้วยังต้องใช้ $\text{NADH}+\text{H}^+$ มากขึ้นอีกด้วย

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

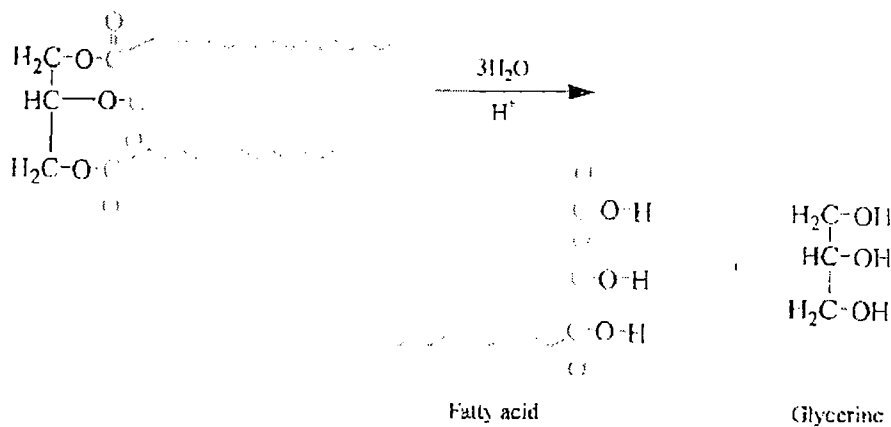
2.3 กlycerol (Glycerol)

2.3.1 ประวัติของ glycerol

สาร glycerol ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสaponification ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่า glycerol เป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบทุกชนิด โดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วย glycerol ที่มีหมู่เอสเตอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่

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

ในช่วงแรก ได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตทาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้ทาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี ค.ศ.1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไนโตรกลีเซอริน (nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม (อมร อุคเสน 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 เกษตรกรรม เชื้อกระดาษ 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

2.3.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีชื่อเรียกทางเคมีตามตารางที่ 2.7 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดัง
แสดงในรูปที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล

| ด้านที่นำไปใช้ ประโยชน์ | การนำไปใช้ (ร้อยละ) | | | |
|---|---|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| | สหรัฐฯ ^a (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 |
| กลีเซอรินไตรอะซิเตท (glycerintriacetate) | ND ^b | 14.4 | ND | ND |
| อาหาร | 14.5 | 5.6 | ND | ND |
| โพลีเอเทอร์แอลกอฮอล์ (polyether alcohol) | 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 ข้อมูลส่วนใหญ่่นำมาจากรายงานของศูนย์ข้อมูลวิศวกรรมเคมีแห่งประเทศจีน
(Chinese Chemical Engineering Information Center)

^b ND ย่อมาจาก no data (ไม่มีข้อมูล)

ที่มา : Wang และคณะ (2001)

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 |

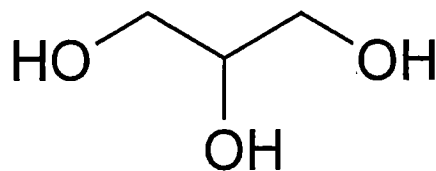
ที่มา : คัดแปลงจาก Mallinckrodt Chemicals และ The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed.

Copyright © 2007, Columbia University Press

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

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซลซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่ หรือแม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ได้แก่ การปรับสภาพคุณสมบัติให้เป็นกรดเพื่อแยกชั้นของกลีเซอรอลกับไขมัน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อแยกตะกอนของเกลือออก จากการทดลองเมื่อทำให้

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 | โชนไบโอดี | 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 |
| เถ้าซักฟอก ร้อยละ โดยน้ำหนักไม่เกิน | 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 | 1.261 ถึง 1.264 | 1.261 ถึง 1.264 | - | 1.261 ถึง 1.264 | - | ISO 2099 - 1972 |
| ที่อุณหภูมิ 25°C/25°C | | | 1.249 | | | |
| ความเป็นตัวหรือความเป็นกรด มีคลอรีนคลอรีนต่อ 100 กรัม ไม่เกิน | 0.064 | 0.32 | - | 0.32 | - | BS 5711 :Part 5 |
| สารหนู มีคลอรีนต่อ 100 กรัม ไม่เกิน | 2 | - | 1.5 | - | 2 | BS 5711 :Part 10 |
| ตะกั่ว มีคลอรีนต่อ 100 กรัม ไม่เกิน | 1 | - | - | - | - | BS 2621 - 5 |
| คลอรีน ร้อยละ โดยน้ำหนัก ไม่เกิน | - | 0.01 | 0.01 | 0.01 | - | BS 5711 :Part 12 |
| สะทอนที่เค้นอีก 100 กรัม มีคลอรีนต่อ 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 : มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรอลบริสุทธิ์, มอก 377-2538

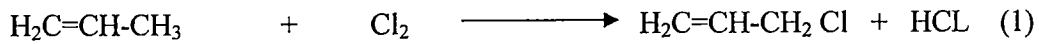
จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลให้หมด มิฉะนั้นกลีเซอรอลจะไปอุดหัวฉีดและยังก่อให้เกิดปริมาณอัลดีไฮด์ในท่อไอเสียเครื่องยนต์ขณะเผาไหม้สูงกว่าปกติอีกด้วย โดยปกติการผลิตไบโอดีเซลแต่ละครั้งจะได้กลีเซอรอลประมาณร้อยละ 10-15 โดยปริมาตร ซึ่งจะทำให้การแยกออกได้ด้วยการทำให้แยกชั้นออกจากไบโอดีเซลด้วยความแตกต่างของความหนาแน่น ไบโอดีเซลมีความหนาแน่น 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลมีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีผลทำให้กลีเซอรอลแยกตัวอยู่ชั้นล่างและไบโอดีเซลอยู่ชั้นบน ในส่วนของชั้นกลีเซอรอลยังคงมีสิ่งเจือปนอื่นได้แก่ ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทานอล หรือแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่และน้ำ เป็นต้น เป็นผลทำให้กลีเซอรอลที่แยกได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

Yong และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณของสารดังนี้ กลีเซอรอลร้อยละ 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 และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลร้อยละ 2.4 และมีพีเอช (pH) เท่ากับ 3.5

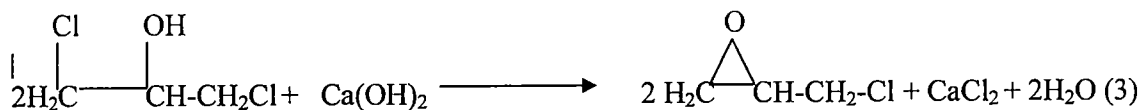
2.3.4.2 กระบวนการทางเคมี (Myers และ Myers, 2007)

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

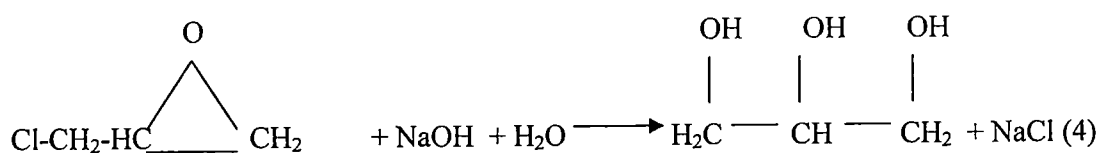
การสังเคราะห์กลีเซอรอลทางเคมีนั้นเริ่มจากการที่คลอรีนเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของ โพรไพสีน ได้เป็นสารอัลลิลคลอไรด์ (allyl chloride) ตามสมการที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรด ไฮโปคลอรัสจะได้เป็น 1,3 ไดคลอโรไฮดริน (1,3 dichlorohydrin) ดังสมการที่ 2



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



ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ (4)



การสังเคราะห์อีกทางหนึ่ง คือ อัลลิลคลอไรด์ถูกไฮโดรไลส์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้ เป็นอัลลิลแอลกอฮอล์ ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$) จากนั้นเติมคลอรีนจะได้โมนอคลอโรไฮดริน (Monochlorohydrin) และไดคลอโรไฮดริน (Dichlorohydrin) ซึ่งทั้งสองจะถูกไฮโดรไลส์ด้วย โซเดียมไบคาร์บอเนตให้กลีเซอรอล

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 เพื่อผลิตเป็นสารเคมี โดยใช้กระบวนการทางชีวภาพให้มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) เอทานอล (ethanol) ซัคซิเนต (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 ความเป็นกรดต่าง (pH) 6.9 และมีอัตราการเจือจาง (dilution rate) เป็น 1.22 ต่อชั่วโมง

Bisping และ Rehm (1986) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกตรึงอยู่ในซินเตอร์กลาส (sintered glass) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 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) โพลีเอทิลีน ไกลคอล 4000 (PEG 4000) และกลีเซอรอล (glycerol) พบว่าสามารถผลิตกลีเซอรอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 179 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารควบคุมแรงดันออสโมติกเป็นกลีเซอรอล ได้ความเข้มข้นเพียง 80 กรัมต่อลิตร และในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารควบคุมแรงดันออสโมติกสามารถผลิตกลีเซอรอลได้เพียง 41 กรัมต่อลิตร

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

Yalcinl และ Ozbas (2008) ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการเจริญเติบโต และจลนพลศาสตร์ของการผลิตกลีเซอรอลแบบกะของเชื้อยีสต์ที่ใช้ผลิตไวน์ สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecikl และ *Saccharomyces cerevisiae* Narince3 โดยทำการศึกษาระดับปริมาณหัวเชื้อตั้งแต่ร้อยละ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 2.5 สำหรับสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Kalecikl 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 และเมื่อทำการศึกษารวมการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้เชื้อ *Torulopsis magnoliae* พบว่ากลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์เดียวที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก และผลิตกลีเซอรอลได้ร้อยละ 17

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

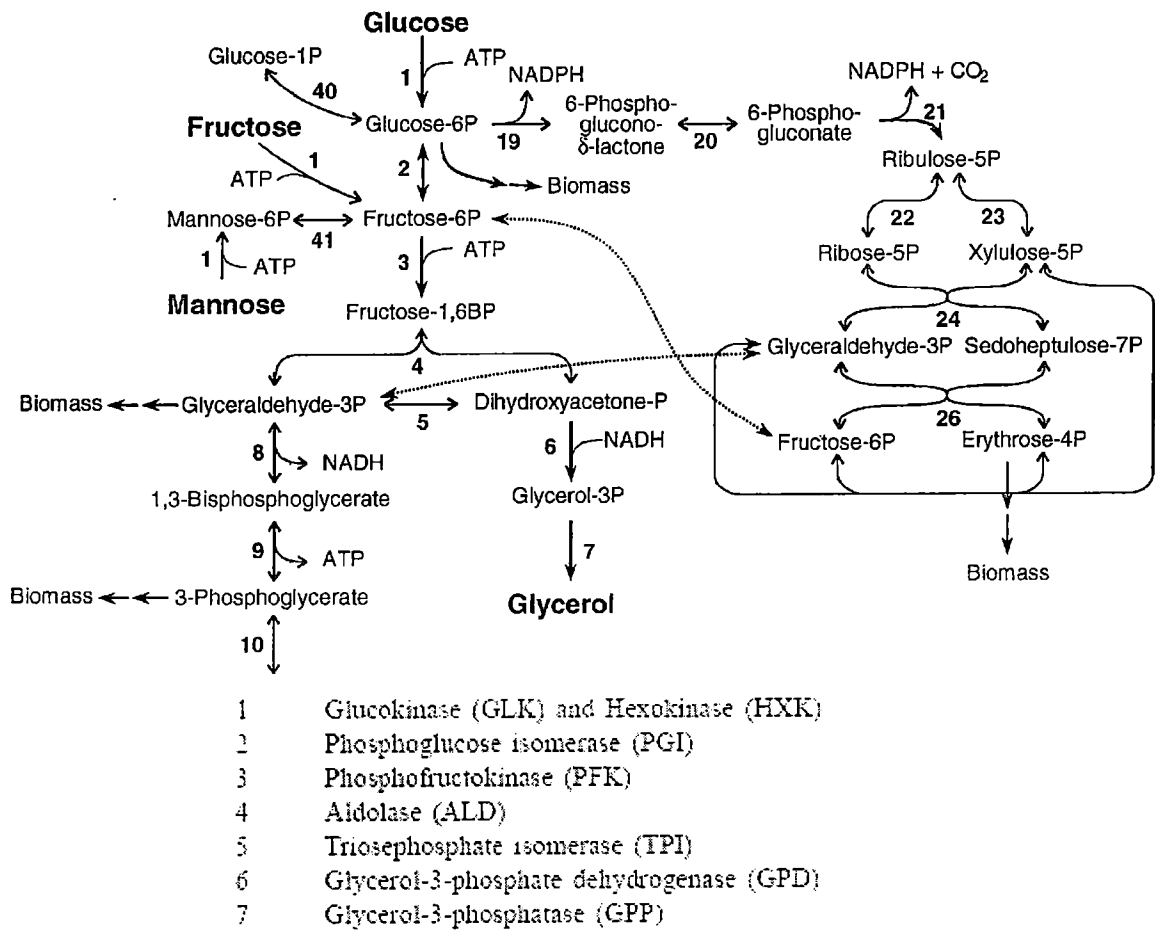
ทั้งนี้ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอลสรุปอยู่ในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกิลีเซอร์อล

| สายพันธุ์ | สารตั้งต้น | กระบวนการ/ระดับการผลิต | ความเข้มข้นกิลีเซอร์อลในอาหาร (กรัมต่อลิตร) | ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล) | อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน) | เอกสารอ้างอิง |
|-------------------------------------|-----------------|--|---|--|--|---------------------------------|
| ยีสต์ | | | | | | |
| <i>S. cerevisiae</i> | กากน้ำตาล | Batch sulfite/ 12 ลิตร | 55 | 25 | 11.5 | Cocking และ Lily, 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 sparging | 80 | 25 | 30 | Kalle และคณะ, 1985 |
| | กลูโคส | Batch alkali steered/ 12 ลิตร | 45 | 23 | 9 | Shade และ Farber, 1947 |
| <i>C. magnoliae I.β¹</i> | 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 |
| <i>P. farinose</i> | กลูโคส | Aerobic fedbatch/ 1 ลิตร | 300 | ND | 75 | Vijaikishore และ Karanth, 1986a |
| <i>C. glycerinogens</i> | กลูโคส | Aerobic batch process/ จาก shake flask ถึง 50,000 ลิตร | 110-130 | 52-63 | 28-32 | Zhung และ Fang, 1995 |
| แบคทีเรีย | | | | | | |
| <i>B. subtilis</i> | กลูโคส | Batch/shake flask | 14.7 | 29 | 2 | Neish และคณะ, 1945 |
| สาหร่าย | | | | | | |
| <i>D. tertiolecta</i> | CO ₂ | Batch | 0.12 | ND | 0.066 | Ben-Amotz และ Avron, 1981 |

ที่มา: Wang และคณะ (2001)

2.3.5 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล



รูปที่ 2.7 เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล

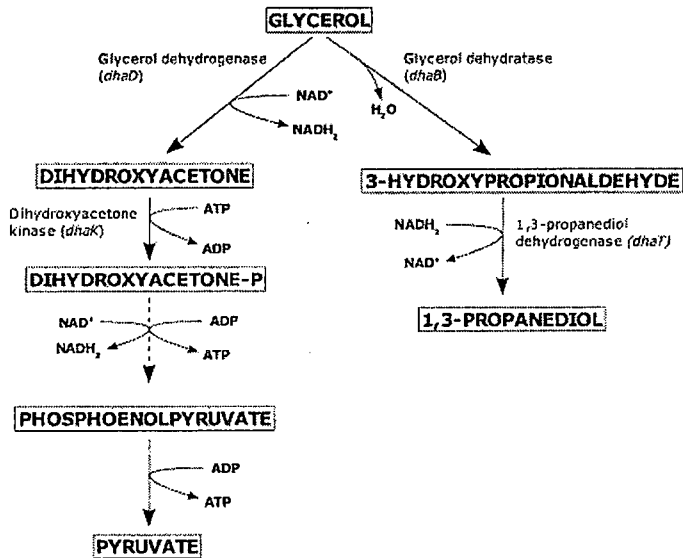
ที่มา : Mostafa (1995)

รูปที่ 2.7 เป็นเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ 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-Andalousi และคณะ, 1995; Biebl, 1991; Biebl และคณะ, 1992; Himmi และคณะ, 1999; Malaoui และ Marczak, 2001; Colin และคณะ, 2001) *Enterobacter agglomerans* (Barbirato และ

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* กลีเซอรอลถูกใช้ในเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้ 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 $\text{NADH}+\text{H}^+$ ($\text{NADH}+\text{H}^+$ 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)



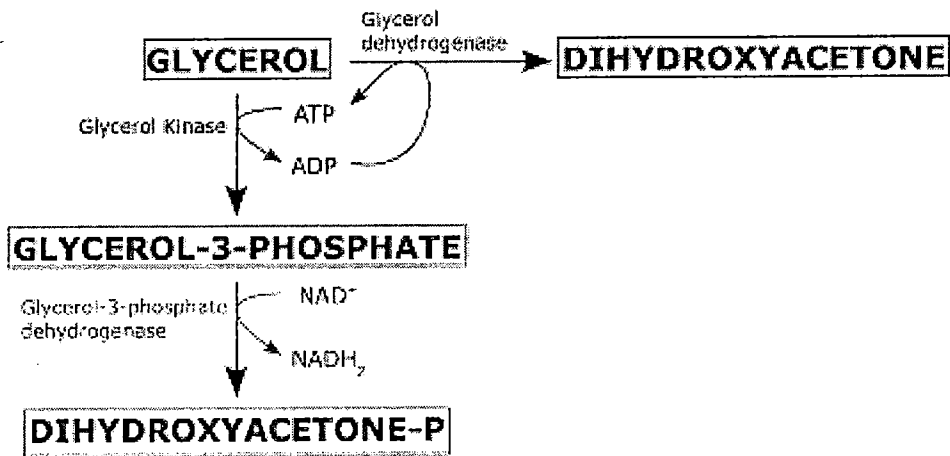
รูปที่ 2.8 ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO

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) ขณะที่สามารถใช้ อันไดอันหนึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไขมันหรือการเปลี่ยนแปลงไปเป็น dihydroxyacetone phosphate และสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดย เอนไซม์ triose phosphate isomerase (EC 5.3.1.1) ในปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (glycolysis) หรือ สามารถนำมาให้เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เมทาบอลิซึมอื่นๆ (Wang และคณะ, 2001) เหมือนวิธีสำหรับ 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 ตาม ด้วย Ruch และคณะ (1974) ซึ่งวิธี glycerol-3-phosphate เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะที่มี อากาศของกลีเซอรอลใน *K. pneumoniae* (เปลี่ยนชื่อมาจาก *K. aerogenes*) ขณะที่วิธี dihydroxyacetone เป็นต้นเหตุสำหรับการแยกสภาวะไม่มีอากาศของสารตั้งต้นนี้

การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C. pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับ การสร้างเป็นผลพลอยได้ (by-product) (Biebl, 2001) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูก สร้างขึ้นใหม่ในวิธี (Biebl และคณะ, 1998) อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการ redox-balanced เป็น

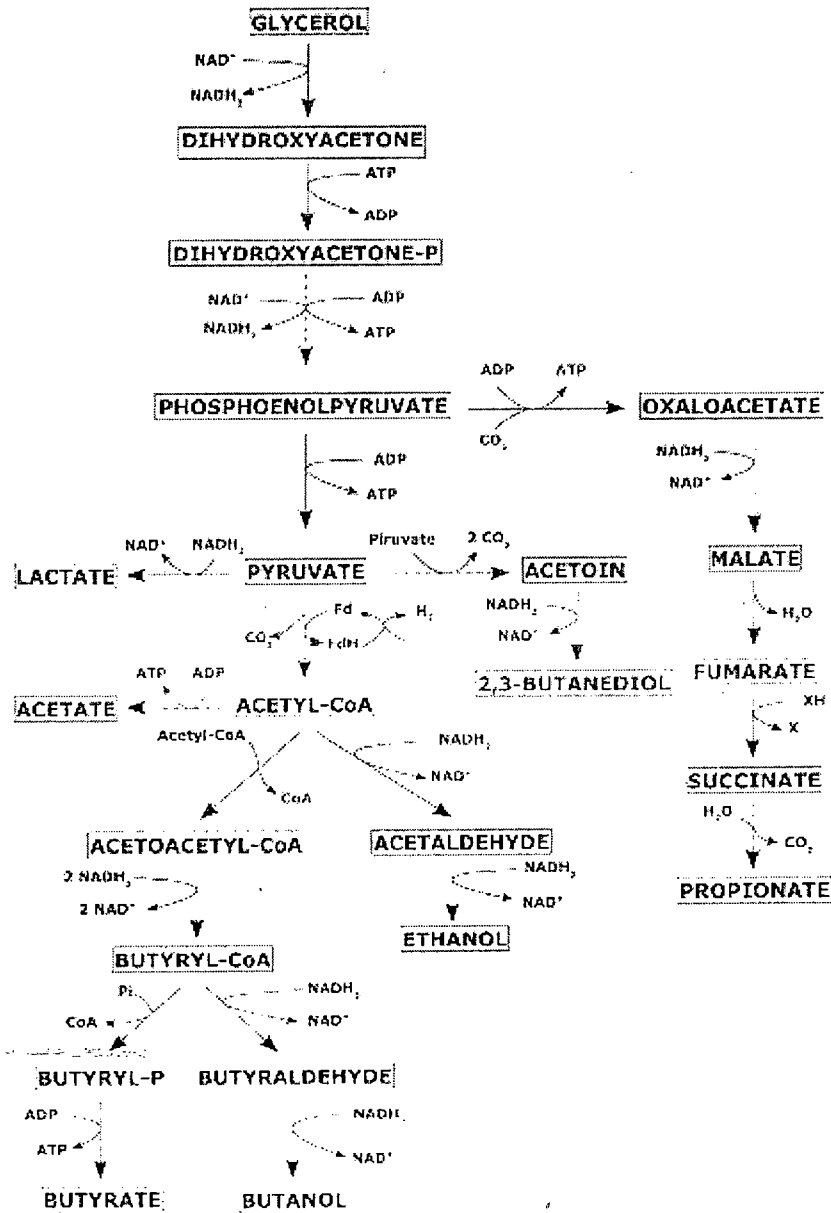
การเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น succinic acid แม้ว่าวิธีสำหรับเอทานอลและ succinate มีค่าเท่ากับ redox-balanced ที่เกี่ยวข้องกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิธี ethanologenic สูงมาก คือ 1ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละ โมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิธี succinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง proton motive force โดย fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.11



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

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

กลีเซอรอลที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจะมีแอลกอฮอล์ น้ำมัน มอนอกลิเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ สบู่ และสิ่งสกปรกอื่นๆ ปนกันอยู่ การทำกลีเซอรินบริสุทธิ์ทำได้โดยนำกลีเซอรอลมาทำปฏิกิริยากับกรด เพื่อให้กลายเป็นกรดไขมันและเกลือ พร้อมทั้งเติมสารละลายเฮกเซนเพื่อละลายสิ่งเจือปนต่างๆ ให้แยกออกจากชั้นกลีเซอริน จากนั้นนำกลีเซอรินไปเติมผงถ่านและกรองออก จะได้กลีเซอรินที่ใสสะอาด เมื่อกั่นเอาแอลกอฮอล์ออก ก็จะได้กลีเซอรินบริสุทธิ์ในที่สุด



รูปที่ 2.10 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย กลีเซอรอล

ที่มา : da Silva และคณะ (2009)

การผลิตไบโอดีเซลจึงยังเป็นกระบวนการที่ไม่คุ้มค่าการลงทุน ดังนั้นในการที่จะขยายกระบวนการผลิตไบโอดีเซลไปสู่ระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพลอยได้ โดยในกระบวนการทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันนั้นจะเกิดกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ดังนั้น

แนวคิดในเชิงเศรษฐศาสตร์แนวหนึ่ง คือ การทำกลีเซอรอลให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้ใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลนั้นต่อไป กลีเซอรอลที่บริสุทธิ์จะมีราคาสูงกว่าเมทิลเอสเทอร์

กลีเซอรอลเป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถกลับมาใช้ใหม่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของการหมักเอทานอลจากกลูโคสหรือเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการที่มีขั้นตอนเริ่มต้นจากไขมันพืช และไขมันสัตว์ มีแบคทีเรียจำนวนมากหมักกลีเซอรอลไปสู่สารเคมี เช่น บิวทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซิติก และกรดแลคติก ตามรูปที่ 2.10 อีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ของกระบวนการผลิต ไบโอดีเซลคือ การแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นสารมูลค่าเพิ่ม โดยการเปลี่ยนกลีเซอรอลไปเป็นบิวทานอล ซึ่งเป็นตัวเด่นที่สุด

2.4 กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

บิวทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศโดยแบคทีเรียไม่ใช้อากาศ (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 ลักษณะตามตัวอย่างแบคทีเรียในจินตตามรูปที่ 2.11 เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิเมตร เป็นพวกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobes) หรือมีบางพวกเป็นแบคทีเรียที่ทนอากาศ (aerotolerant) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว มีความสามารถในการสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย ตามรูปที่ 2.12 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น การขาดสารอาหาร เป็นต้น สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อความร้อน ความแห้ง และสารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมทาบอลิซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงัก จนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ (จรรยา, 2541)

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 สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์เลซิทีเนส (lecithinase) โดยดูจากลักษณะตกตะกอนปูนขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากความเป็นเงา (iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

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

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

เชื้อ *Clostridium* เป็นพวกที่ไม่มีระบบไซโทโครม และกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เพื่อสร้างสารพลังงาน ATP ดังนั้นการได้มาซึ่ง ATP จึงต้องผ่านกระบวนการ ชับสเตรท-เลเวล-ฟอสโฟ-รีเลชั่น (substrate-level-phosphorylation) . การจัดจำพวกในระดับจีนัสออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ จะใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้สารชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *C. cellodiparum* และ *C. thermocellum* สามารถหมักเซลลูโลสแล้วให้ผลเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) กรดซักซินิก (succinic acid) เอทานอล (ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และไฮโดรเจน (H₂) ส่วน *C. butyricum* *C. pasteurianum* *C. perfringens* และ *C. acetobutylicum* หมักน้ำตาล แป้ง และแป้งดิน ให้ผลลัพท์เป็นอะซีโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) กรดบิวทริก (butyric acid) กรดอะซิติก (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และไฮโดรเจน (H₂)

2.4.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก

ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นเรียกช่วงนี้ว่า อะซิโดเจนิซิสเฟส (Acidogenesis phase) โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซี-ทิลโคเอ (acetyl CoA) และอะซีทิลโคเอ จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) และบิวไทริลโคเอ (butyryl CoA) ก่อนเปลี่ยนเป็นกรดบิวทริก (butyric acid) ในช่วงนี้ความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง จากนั้นแบคทีเรียจะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวทำละลายต่างๆ โดยกรดอะซิติกจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีโตน ส่วนกรดบิวทริกจะถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และอะซีทิลโคเอเปลี่ยนเป็นอะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งอะซีทัลดีไฮด์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล เรียกช่วงนี้ว่า โซลเวโทเจนิซิสเฟส (Solventogenesis phase) ในขั้นตอนนี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างสูงขึ้นและจะมีการนำกรดอินทรีย์มาใช้เป็นบางส่วน ซึ่งค่าความเป็นกรดต่างที่ อะซิโดเจนิซิสเฟสเปลี่ยนเป็น โซลเวโทเจนิซิสเฟส เรียกว่า จุดเปลี่ยนค่าความเป็นกรดต่าง (pH transition point) หรือ จุดยุติค่าความเป็นกรดต่าง (pH break – point) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากรดอินทรีย์ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นด้วย วิธีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล แสดงดังรูป 2.5

2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณบิวทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญและองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่นๆ

2.4.3.1 สารตั้งต้น

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Clostridium* วัสดุที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลและสารคาร์โบไฮเดรตในรูปต่างๆ ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและโพลิเมอร์ ซึ่งอาจจำแนกได้ดังนี้ ประเภทที่หนึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวโพค มันทำปะหลัง และมันเทศ เป็นต้น ประเภทที่สอง เป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาลหางนม เป็นต้น และประเภทที่สาม เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ได้แก่ ฟางข้าวและซังข้าวโพค เป็นต้น

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

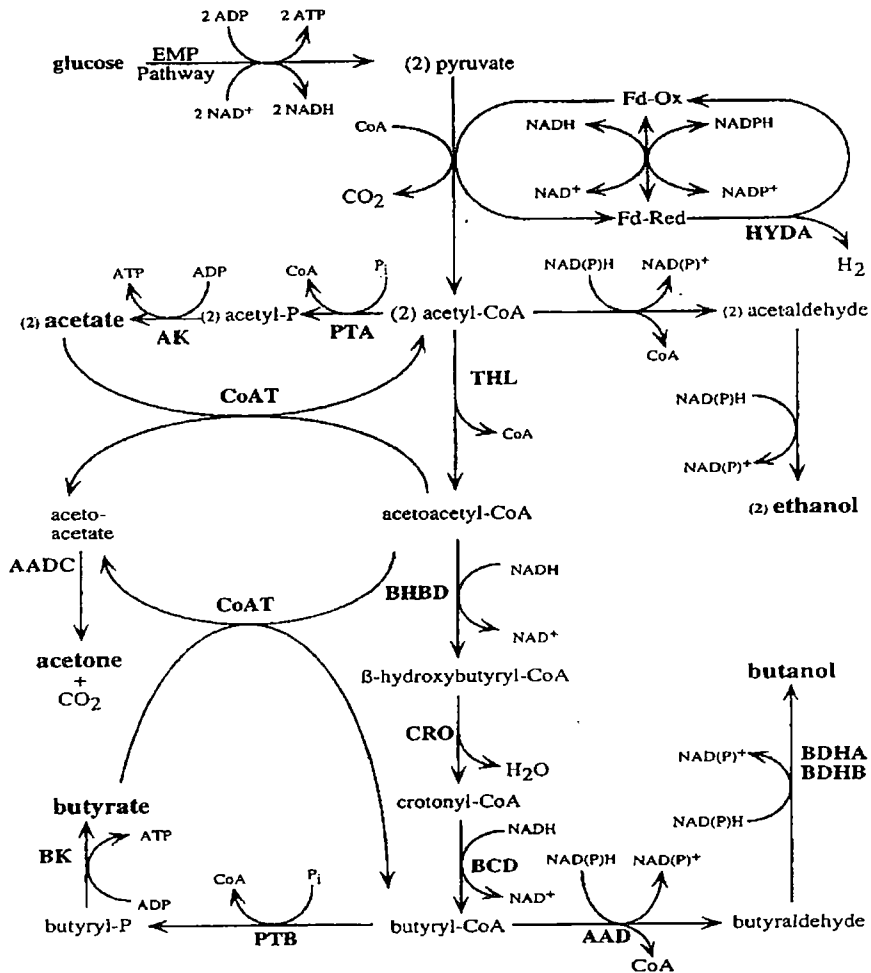
หากใช้น้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียชนิดนี้จะมีวิธีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลตามรูปที่ 2.13

2.2.3.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ในการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล มีรายงานว่า การกำจัดปริมาณคาร์บอนเป็นอันตรายต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้การจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดในขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2.2.3.3 อุณหภูมิ

McCutchan และ Hickey (1954) ทำการศึกษาอุณหภูมิในการหมักที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมัก มีรายงานว่า การใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30 องศาเซลเซียสและ 33 องศาเซลเซียส แต่การผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลองคล้ายกับการทดลองการหมักในอาหารสังเคราะห์ (synthesis medium)



รูปที่ 2.13 วิธีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทิลเลส (phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอลเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีทิล-โคเอ:อะซีเตต-บิวทีเรต:โคเอ ทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-CoA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซีเตต ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBH แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทีริล-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทีริล-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทีเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทีเรต ไคเนส (butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA & BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส บี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)

ที่มา: Ruchir และคณะ (1999)

2.2.3.4 ออกซิเจน

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

2.2.3.5 ระดับความเป็นกรดต่าง (pH)

ในน้ำหมักความเป็นกรดต่างจะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล หากรักษาระดับความเป็นกรดต่างของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรดในทางตรงข้ามถ้ารักษาค่าความเป็นกรดต่างไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์อย่างไรก็ตามช่วงของความเป็นกรดต่างที่จะทำให้มีการผลิตสารละลายอยู่ในช่วงกว้าง ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะในการหมัก (Jones และ Woods, 1986) ช่วงความเป็น กรดต่างที่มีการสร้างสารละลายมักอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่าง 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 และสุวิญษา, 2548)

2.2.3.7 Clostridial degeneration

กลไกการเกิดความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์บ่งชี้ได้จาก (1) การสร้างกรดที่มากเกินไประหว่างการเจริญในช่วง การเติบโตแบบทวีการ(exponential phase) ซึ่ง Eva และคณะ (1995) ได้รายงานไว้ว่า *C. beijerinckii* NCIMV 8052 มีการใช้กลูโคสในการหมักซึ่งจะได้กรดอะซีติกและกรดบิวทริก ในอัตราที่มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ความเป็นกรดต่างลดลงและเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในช่วงของการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis phase) ได้และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น (2) Hugh และ Chen ในปี 1995 ได้คัดแยกสายพันธุ์กลายของ *C. beijerinckii* NCIMV 8052 ซึ่งมีความทนทานต่อความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัว

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

2.5 ลักษณะวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

| | | |
|---------|---|--------------------|
| Kingdom | : | Bacteria |
| Phylum | : | Firmicutes |
| Class | : | Clostridia |
| Order | : | Clostridiales |
| Family | : | Clostridiaceae |
| Genus | : | <i>Clostridium</i> |

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

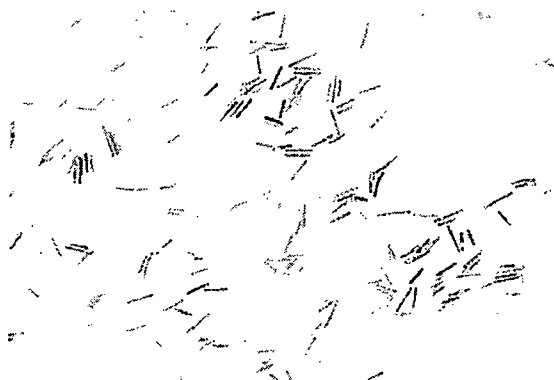
การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 10 - 15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (Subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร Thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24 - 48 ชั่วโมง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

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*

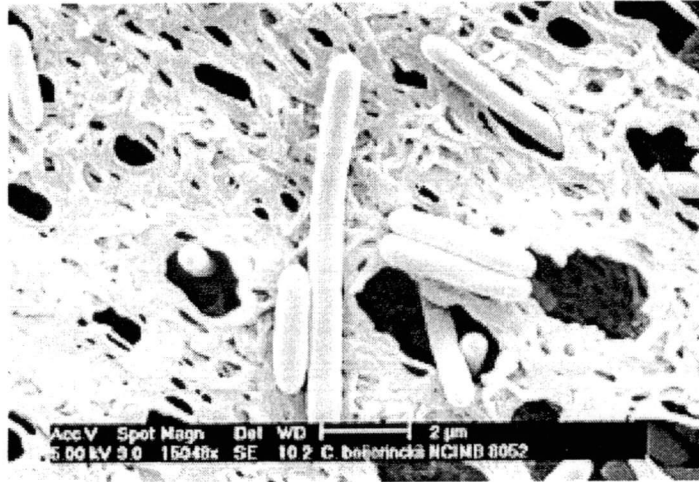
ที่มา : www.scribemedica.org/2007/09/18/nanologix-clostridia/ (25/04/2554)

Clostridium acetobutylicum รูปร่างเป็นแท่งตรง ตามที่แสดงในรูปที่ 2.14 เคลื่อนที่โดยใช้ peritrichous flagella สปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ก่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ สีขาวเทา โปร่งแสงเป็นมัน เจริญได้ดีเล็กน้อยในอาหาร NB แต่ถ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมักจะเจริญได้ดี หมักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีกรดอะซิติก บิวทิวริก บิวทานอล และสร้างอะซีโตน สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจน พบทั่วไปในดิน

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

Clostridium acetobutylicum นั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแป้งโดยใช้กระบวนการ ABE (Acetone Butanol Ethanol process) ในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตดินปืน และดินระเบิด กระบวนการ ABE กลายมาเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมจนกระทั่งปลายปี 1940 เมื่อน้ำมันมีราคาตกลงทำให้มีผลกระทบต่อกระบวนการพื้นฐานของการแยกไฮโดรคาร์บอน 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 จะมีการสร้างสปอร์เป็นรูปท่อนปล้องมีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ในระดับอุตสาหกรรมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น บิวทานอล อะซีโตน และไอโซโพรพานอล ณ สภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 °C จะมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีความหลากหลาย(ไม่จำกัดจำนวน) ซึ่งรวมถึง เพนโดส เฮกโซส และแป้ง ข้อดีของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ มีความสามารถในการเติบโตที่ง่าย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพงในการเพาะเลี้ยง มีความเสถียรของสายพันธุ์ที่ทนต่อการเสื่อมสภาพ มีการปรับตัวดีในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง และตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในระยะ Log phase เป็นต้น *Clostridium beijerinckii* สามารถหมักแป้งได้เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ และได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย นอกจากนี้ *Clostridium beijerinckii* บางสายพันธุ์จะผลิตไอโซโพรพานอลออกมาด้วยนอกเหนือจากอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนี้สามารถกำหนดสภาวะให้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการได้ รวมทั้งยังศึกษาความเป็นไปได้ที่จะมีประยุกต์ใช้เศษวัสดุคิบเหลือใช้มาประยุกต์ใช้เพื่อทำการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่างๆ เพื่อเป็นการลดต้นทุนด้านวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต โดยทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง รวมไปถึงช่วยลดปัญหาหมักภาวะที่มาจากเศษวัสดุคิบ เหลือใช้จากทางการเกษตร

จิรกันต์และคณะ (2544) ศึกษาพัฒนา เทคโนโลยีการผลิต n-butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน การศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium butylicum* NRRL B592 และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบ มันสำปะหลังสด มันสำปะหลังแห้งย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งมันสำปะหลัง และผักตบชวาแห้งย่อยด้วยกรด ผลจากการทดลองพบว่าการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดที่ค้ำน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ให้บิวทานอลสูงสุด (11.1-11.3 กรัมต่อลิตร) การเพิ่มผลผลิตสามารถทำได้โดยการพัฒนากระบวนการผลิต จากการทดลองหมักอะซิโตน 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) แบบเบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอลิซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นตอนของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นตอนของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตดและบิวทาเลด กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

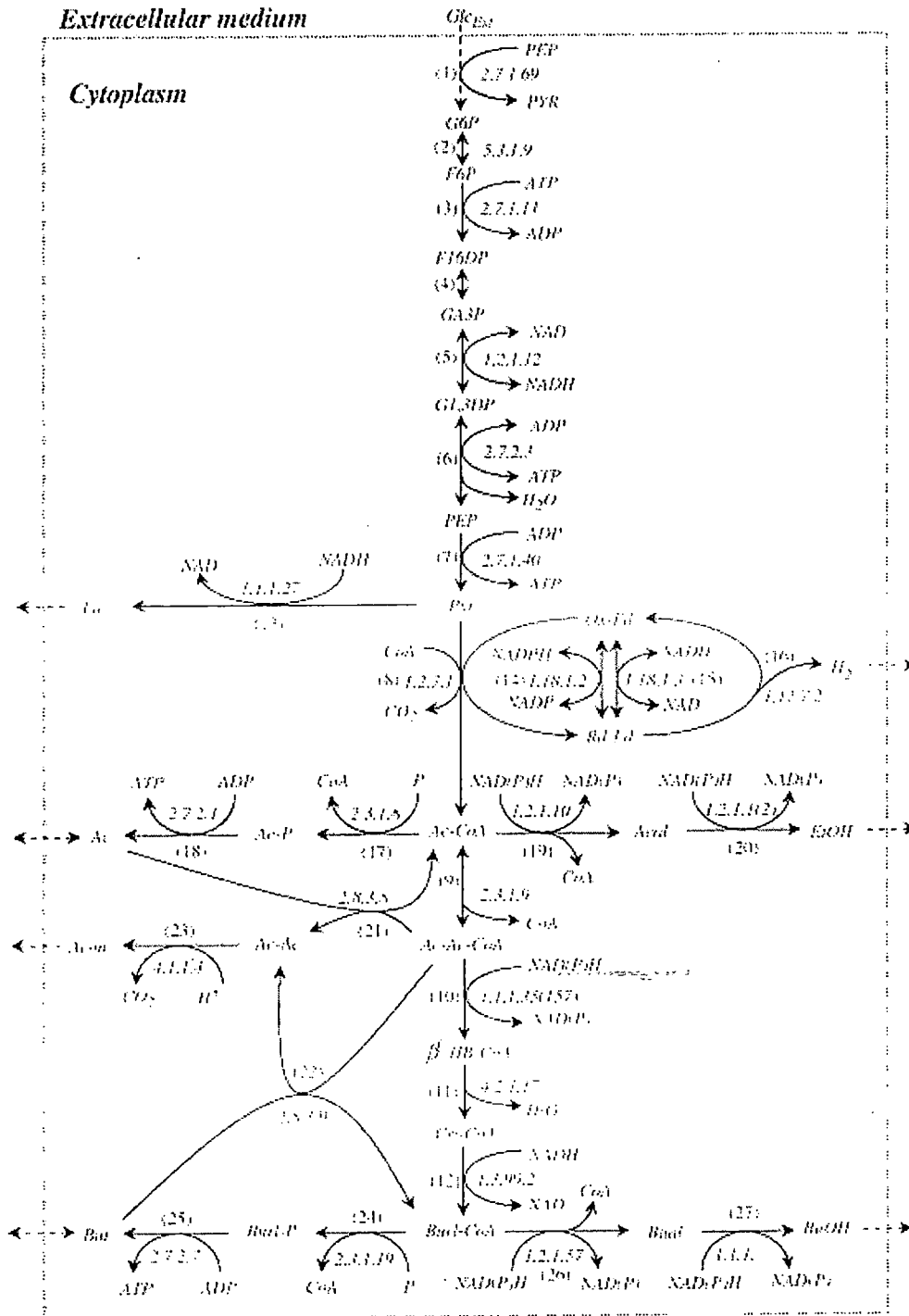
ในกระบวนการหมักขั้นที่สอง (BalLongue และคณะ, 1985) กรดที่เกิดขึ้นมาก่อนหน้านี้จะกลับเข้าไปยังเซลล์ และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrates) สำหรับการผลิตสารละลายที่เป็นกลาง (Fond และคณะ, 1985; Kell และคณะ, 1973) เมื่อมาถึงในขั้นตอนนี้ กระบวนการผลิตกรดจะสิ้นสุดลงพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะสิ้นสุดลงเช่นกัน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

จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดถูกดูดกลืนเข้าไปในเซลล์ (Terracciano และ Kashket, 1986; Spivey, 1978) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนไปของกระบวนการผลิตสารละลายนั้น คือการที่เซลล์ปรับตัวเพื่อตอบสนองต่ออาหารที่มีค่า pH ต่ำ อันเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตกรด ผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายที่ได้จากการหมักนี้คือบิวทานอล โดยมีอะซิโตน 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 (hexokinase, 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)



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

ที่มา: Gheshlaghi และคณะ (2009)

โดยทั่วไป เชื้อจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* DG1 เป็นเชื้อที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว แต่สายพันธุ์ผสมจะสามารถเติบโตได้ในแหล่งคาร์บอนนี้ ซึ่งจะใช้เอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส (glycerol kinase) และเอนไซม์กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) สำหรับการออกซิไดซ์กลีเซอรอล โดยที่กลีเซอรอล 1 โมลที่ถูกใช้ไปจะให้ ATP 1 โมลและ NADH 2 โมล *C. acetobutylicum* ได้แสดงให้เห็นถึงการมีเอ็นหลาย ๆ ตัวที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายเซลล์ูลอส (Nolling และคณะ, 2001) แต่ไม่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ (Mitchell, 1998) clostridia กลุ่มที่ย่อยน้ำตาลได้จะสามารถเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลคเตตได้ โดยเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) อย่างไรก็ตาม ไพรูเวตส่วนใหญ่จะเข้าไปในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตเฟอเรออกซินออกซิโดรีดักเทส (pyruvate-ferredoxin oxidoreductase) ไปเป็นอะเซตทิวโคเอ (acetyl-CoA) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) กับการลดลงของเฟอเรออกซิน (ferredoxin) ไปพร้อม ๆ กัน

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต 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 เติมน้ำกลีเซอรอลในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่า การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต และการใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) ไม่มีผลกระทบต่อผลผลิตบิวทานอลแต่การเติมสาร ethyl methane sulphonate (EMS) นั้นมีความสามารถในการเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้ร้อยละ 20

Qureshi และคณะ (2008a) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาลีที่ผ่านการใส่อัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ : การผลิตบิวทานอลจากฟางต้นข้าวสาลีที่ผ่านการย่อยโดยใช้ *Clostridium beijerinckii* ในถังหมักแบบกะ โดยมีใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในขวดฝาเกลียวขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาลีที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ จะพบว่าสามารถผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้ 21.37 และ 22.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

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

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

Qureshi และคณะ (2010) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดและการย่อยหญ้า switchgrass โดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลของการทดลองจะเห็นว่า การทดลองควบคุมจะใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ผลลัพธ์ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลทั้งหมดเท่ากับ 21.06 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิว-ทานอล เอทานอลคือ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดโดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะไม่แสดงการเจริญเติบโต และไม่เกิดการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ใดๆก็ตามเมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำและเจือจางด้วยการหมักการย่อยฟางข้าวสาลี (อัตราส่วน 1:1) ผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะมีค่าความเข้มข้นเป็น 16.00 และ 18.04 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลลัพธ์ของอัตราผลผลิต (productivity) มีค่าระหว่าง 0.17-0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการปรับสภาพด้วยการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพด ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ (เรียกว่ากระบวนการ Overliming) จุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลได้ 26.67 กรัมต่อลิตร การย่อยหญ้า switchgrass โดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะทำให้ผลของการหมักต่ำ และจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลมากกว่า 1.48 กรัมต่อลิตร หรือมากถึง 14.61 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การปรับสภาพสารชีวมวลไม่สามารถที่จะหยุดการสร้างยับยั้งที่มาจาก การทดลองได้ หรืออีกประการหนึ่ง เชื้อจุลินทรีย์ทนต่อสารยับยั้งและสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่มีความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งอาจใช้สำหรับเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการหมักอื่นๆให้ดีขึ้น

Turkish (2008) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตบิวทานอลโดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* ที่กลายพันธุ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากกากน้ำตาลในสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต การกลายพันธุ์โดยใช้สาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) และ ethyl methane sulphonate (EMS) โดยมีการใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการหมักในถังหมักขนาด 14 ลิตร โดยมี pH เริ่มต้นที่ 6.2 และไม่ควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดกระบวนการหมักเติมก๊าซไฮโดรเจนในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะปลอดออกซิเจน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงจะพบว่า การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต และการใช้สาร N-methyl-N-

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

Qureshi และคณะ (2008) ศึกษาการกำจัดสารยับยั้งการหมักที่มาจากฟางของต้นข้าวสาเล่ที่ผ่านการใส่ฮัลคาไลน์เพอร์รอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้ *Clostridium beijerinckii* มาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตบิวทานอลในถังหมักแบบกะ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักในในขวดฝาเกลียวปิดขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคสในการหมักและกลุ่มที่ใช้ฟางข้าวสาเล่ที่ถูกย่อยและกำจัดเกลือ 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) แบบเบช (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอลิซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นตอนของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นตอนของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตดและบิวทาเลด กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่า pH ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการ ชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

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

ต่อมา ในปี ค.ศ. 2004 Tashiro และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่ควบคุมความเป็นกรดค้างให้คงที่ด้วยการเติมกรดบิวทริก และกลูโคส จากการทดลองพบว่าการเติมกรดบิวทริกลงไปในการหมัก สามารถเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ การผลิตอะซีโตน บิวทานอล และผลได้ของตัวทำละลายด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้โดยกระบวนการเติมกรดบิวทริกและกลูโคส สามารถควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารให้อยู่

ในระดับต่ำได้อย่างสม่ำเสมอ และได้ผลได้ของบิวทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 1.5 เท่า นอกจากนี้ยังได้อัตราผลผลิตบิวทานอลจำเพาะ (specific butanol product rate) มากกว่า 0.10 กรัมต่อกรัมต่อลิตรที่เวลา 39 ชั่วโมงของการหมัก เมื่ออัตราการส่วนระหว่างกรดบิวทริกและกลูโคสเท่ากับ 1.6 และพบว่า การเติมกรดบิวทริก และการควบคุมความเป็นกรดต่างให้อยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 5.5) จะไม่พบการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเติมกรดอะซีติกลงไป ในอาหารจะเพิ่มการผลิตอะซีโตนเท่านั้น

ในปี ค.ศ. 1982 Bahl และคณะรายงานว่า การเติมกรดอะซีติก และบิวทริก ลงในการหมักแบบกึ่งกะที่ใช้ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ทำให้ผลได้ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Monot และคณะ ได้รายงานว่า กรดบิวทริกที่ถูกเติมลงในอาหารหมัก เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตบิวทานอล โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 จากผลการทดลองยังพบว่า ความเป็นกรดต่างของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลาย ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างสูง การหมักจะได้กรดอินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่การหมักในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างต่ำ จะได้ตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งการผลิตตัวทำละลาย โดยใช้ เชื้อจุลินทรีย์ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 จะเพิ่มขึ้นที่ความเป็นกรดต่าง 5.0 ซึ่งให้ผลคล้ายการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลด้วย *Clostridium* ชนิดอื่น

ในปี ค.ศ. 1997 Formanek และคณะ พบว่าในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องใน อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 กึ่งแข็ง 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 พบว่าความเป็นไปได้ในการใช้แป้งข้าวโพดในการผลิตอะซีโตน 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 เอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงด้วยการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และการดึงเซลล์ออกจากการทดลองพบว่า การหมักอย่างต่อเนื่องที่ไม่มี การนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราการเจือจางวิกฤติ (critical dilution rate) เท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง และให้อัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล รวมกันเท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.20 ต่อชั่วโมง สำหรับการหมักอย่างต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอ

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 การย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลในการผลิตคือได้ อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เป็นปริมาณ 7.09 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล 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 การเปรียบเทียบนี้จะชี้ให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางเป็นพิษต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อลดผลของความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นนี้ ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางจะได้รับการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ $[Ca(OH)_2]$ ตามด้วยการหมัก การปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางจะทำให้การหมักประสบผลสำเร็จ และความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้เท่ากับ 26.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้ดีกว่าการควบคุมการหมักและการหมักฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางและไม่ผ่านการปรับสภาพ (ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร) ในการหมักผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เท่ากับ 0.43 และได้อัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (390% ของการหมักที่ไม่ผ่านการปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง และการใช้ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางโดยไม่เจือจางน้ำตาล) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง ทำให้ได้อัตราผลผลิตเฉพาะ (specific productivity) เท่ากับ 0.55 ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 0.12 ต่อชั่วโมงของการควบคุมการหมักที่มีการควบคุมการกระตุ้นของคาร์บอนที่มากขึ้น ซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์การหมักโดยตรง

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) | ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$) |
| แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | แคลเซียมคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) |
| โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) | สารสกัดจากยีสต์ |
| แบคโตเปปโตน | สารสกัดจากเนื้อ |
| อีดีทีเอ (EDTA) | เฟอร์รัสซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) |
| แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) | คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) |
| บอริกแอซิด (H_3BO_3) | โซเดียม โมลิบเดต-2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) |
| นิกเกิลคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($NiCl_2 \cdot 2H_2O$) | ซิงค์ซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) |
| กรดอะซิติก | กลูโคส |

| | |
|------------------|--------------------|
| แอมโมเนียมซัลเฟต | ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต |
| แคลเซียมคลอไรด์ | แคลเซียมคาร์บอเนต |
| กรดไฮโดรคลอริก | โซเดียมโมลิบเดต |

3.3 อุปกรณ์

| | | |
|----------------------------------|----------------------------|--------------------|
| ฟลากัส | บีกเกอร์ | จานเพาะเลี้ยงเชื้อ |
| ขวดเก็บอาหาร (Duran ®) | หลอดทดลอง | หลอดทดลองฝาเกลียว |
| Anaerobic jar | แท่งแก้วคน | กระบอกตวง |
| ตะเกียงแอลกอฮอล์ | เข็มเย็บเชื้อ | หลอดหยด |
| ปิเปต | จุกยางดูดสาร | จุกสำลี |
| จุกยางปิดฟลากัส | หลอดปั่นเหวี่ยง | ขวดเก็บตัวอย่าง |
| เครื่องเขย่า | ตู้บ่ม 30, 37 องศาเซลเซียส | เครื่องปั่นเหวี่ยง |
| ขวดลูกชมพู่ | เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ | หม้อนึ่งอัตโนมัติ |
| ตู้เย็น | ถังแก๊สไนโตรเจน | เครื่องชั่ง |
| เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex) | | |

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---|----|------|
| เคซีน เอนไซมามิก ไฮโดรไลเซต (Casein enzymatic hydrolysate) | 10 | กรัม |
| สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) | 10 | กรัม |
| สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) | 3 | กรัม |
| สารละลายเดกซ์โตรส (Dextrose) | 5 | กรัม |
| สารละลายโซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride) | 5 | กรัม |
| สารละลายโซเดียม อะซิเตต (Sodium acetate) | 3 | กรัม |
| สารละลายแป้ง (Starch soluble) | 1 | กรัม |

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

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ มาละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งอัตโนมัติ

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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0.2 | กรัม |
| เฟอร์ริกซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0.01 | กรัม |
| กรดอะซิติก (acetic acid) | 2.2 | กรัม |
| ไบโอติน (biotin) | 0.04 | กรัม |
| กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-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 โมลาร์

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูตรที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* (Badr, Toledo และ Hamdy, 2000) หรืออาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (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 (K_2HPO_4) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ | 2.5 | กรัมต่อลิตร |

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

อะซิเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer)

| | | |
|--------------------------------------|-----|------|
| KH_2PO_4 | 0.5 | กรัม |
| K_2HPO_4 | 0.5 | กรัม |
| แอมโมเนียมอะซิเตต (Ammonium acetate) | 2.2 | กรัม |

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)

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

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Minerals solution)

| | | |
|---|------|------|
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 | กรัม |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0.01 | กรัม |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 | กรัม |
| NaCl | 0.01 | กรัม |

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) 1 กรัม

ซึ่งสารสกัดยีสต์ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

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

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutyricum* ดังมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 แลลละ 3.4.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้ว ทำการเขี่ยเชื้อ 1 ลูกจากอาหารแข็ง reinforced clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาคส์ขนาด 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) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ฟลาคส์ ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Reinforced Clostridial ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 60 มิลลิลิตร ต่อมา ทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปฟลาคส์เพื่อไล่ออกซิเจนเป็นเวลา 2 นาที ปิดปากฟลาคส์ด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากความขุ่นและฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

3.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใส่กลีเซอรอลเป็น 10 20 30 และ 40 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 และ 168 ชั่วโมง โดยจะนำมาทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดต่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 และ 660 นาโนเมตรซึ่งวัดได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และค่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) จากนั้น นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสารเคมีในขั้นตอนนี้ต่อไป

3.6.2 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในระดับฟลาस्क

ในการทดลองจะทำการหมักในฟลาस्कขนาด 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 ฟลาस्क 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

ตารางนี้ เป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำมาล้างหมักที่มีอาหารอยู่ภายในที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาต่อเข้ากับปั๊ม เครื่องทำความเย็น (cooling) ตั้งอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้อาหารมีสภาวะ ไร้อากาศ หลังจากนั้นทำการลงเชื้อจาก Pre – culture ที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 3.5.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะ ไร้อากาศ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ 144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ใบพัด

ทำการเตรียมการอาหารและ Pre-culture รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการหมักให้เหมือนกับหัวข้อ 3.6.2 แต่เพิ่มสภาวะการกวนเข้าไป โดยทำการกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที และเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ 144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทความเข้มข้น 20 และ 60 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอล เป็นสับสเตรทความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายวิตามินและสารละลายเกลือแร่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมครอนเรียบร้อยแล้ว แบ่งใส่ฟลากลัส ขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 24 ฟลากลัส ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ ลงในแต่ละฟลากลัส ละ 5 มิลลิลิตร ต่อมทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปฟลากลัสเพื่อไล่ออกซิเจน ปิดปากฟลากลัสด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์

ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มด้วยการเจือจางเป็นชุด (series dilution) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) เริ่มจากหาลอมอาหารเพาะเชื้อให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็น

ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมตัวอย่างอาหารให้เจือจางได้ความเข้มข้นช่วงที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในงานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 จาน โดยเรียงงานทั้ง 3 ซ้อนกัน ดูดอาหารใส่จานล่างสุดก่อน แล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุด เช่นเดียวกัน เขย่างานที่ซ้อนอยู่ทั้ง 3 ใบพร้อมกันโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่งานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยกลับงานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อ มิลลิลิตร)

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิซ (Bergmeyer และ Grassel, 1983)

นำส่วนใสของตัวอย่างช่วงเวลาละ 3 ชั่วโมงที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้ ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ DNS 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำที่จืดและเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยใช้แบลนด์ (blank) เป็นน้ำกลั่นแทนน้ำตาลกลูโคส จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิซจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมสารละลายมาตรฐานมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 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 ด้วยสารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็น internal standard จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทริก 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 โมลาร์ 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

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

บทที่ 4

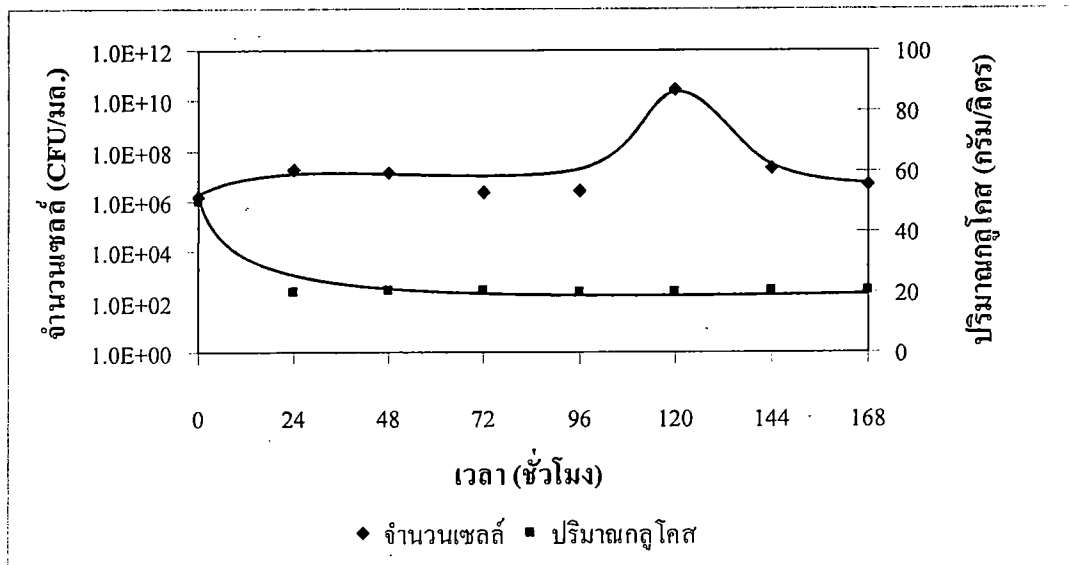
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1

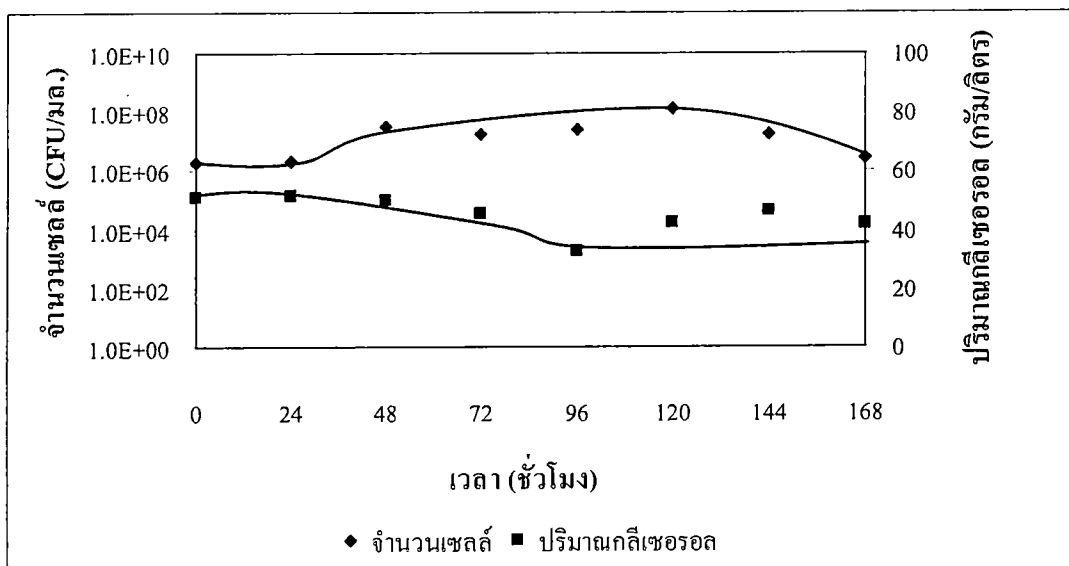
4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงเดียวของเชื้อ *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} และ 10^{-8} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสและกลีเซอรอลโดยเครื่อง HPLC ได้ผลการทดลองตามรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และ 4.2



(ก)



(ข)

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

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 \pm 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

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 \pm 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 Dure (2008) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี จากนั้นจำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณลดลงตามเวลาที่ผ่านไป 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

1462 ใช้กลีเซอรอลไปเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 18.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลนั้นจะมีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ไปในทางเดียวกับชุดควบคุมซึ่งมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120

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

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

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) ที่ทำการทดสอบหาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* (เปลี่ยนชื่อจาก *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้

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 1.33×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่ามีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากที่สุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เป็น 5.33×10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง

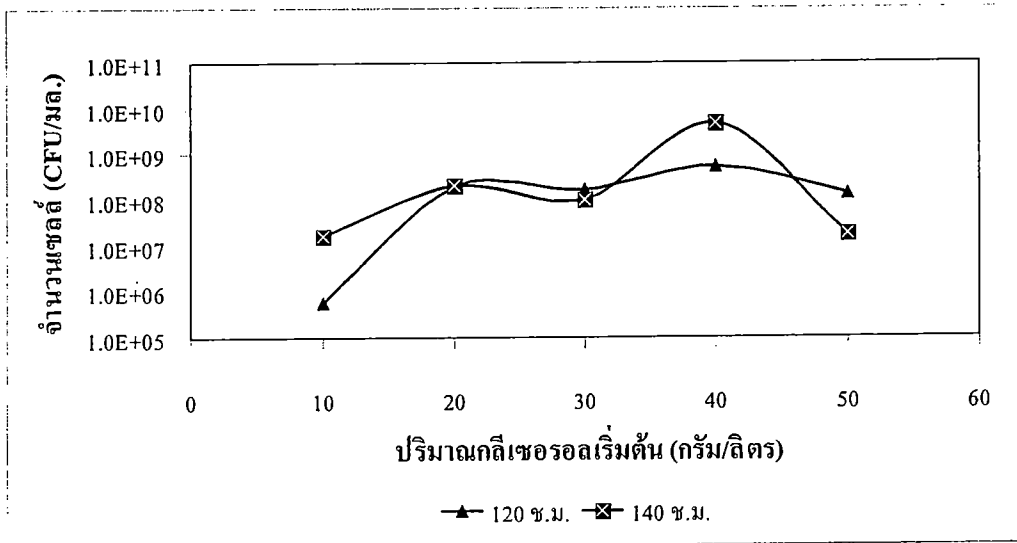
| ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ชั่วโมงที่ 120 (CFU/mL) | ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร) |
|--|---|----------------------------------|
| 10 | $(5.73 \pm 0.22 \times 10^5)^b$ | nd. |
| 20 | $(1.97 \pm 0.16 \times 10^8)^b$ | nd |
| 30 | $(1.64 \pm 0.31 \times 10^8)^b$ | 17.00 |
| 40 | $(5.33 \pm 0.25 \times 10^8)^a$ | 39.50 |
| 50 | $(1.33 \pm 0.29 \times 10^8)^b$ | 42.50 |

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ที่ ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง

| ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร) | จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ชั่วโมงที่ 144 (CFU/mL) | ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร) |
|--|---|----------------------------------|
| 10 | $(1.63 \pm 0.40 \times 10^7)^b$ | nd |
| 20 | $(2.01 \pm 0.86 \times 10^8)^b$ | nd |
| 30 | $(1.00 \pm 0.20 \times 10^8)^b$ | 17.00 |
| 40 | $(4.80 \pm 0.85 \times 10^9)^a$ | 36.00 |
| 50 | $(1.70 \pm 0.46 \times 10^7)^b$ | 46.50 |

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด



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

และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะพบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณ 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 กรัมต่อลิตร และ 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 จากนั้นนำผลจำนวนเซลล์ที่ได้จากการหมักมาเปรียบเทียบกับกันทางสถิติจะพบว่าการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 4.80×10^9 CFU ต่อ

มิลลิลิตร ในขณะที่เดียวกันนั้นจะพบว่าปริมาณกลีเซอรอลนั้นจะมีค่าลดลงมากที่สุดในการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไปในการเจริญเติบโตประมาณ 13 กรัมต่อลิตร

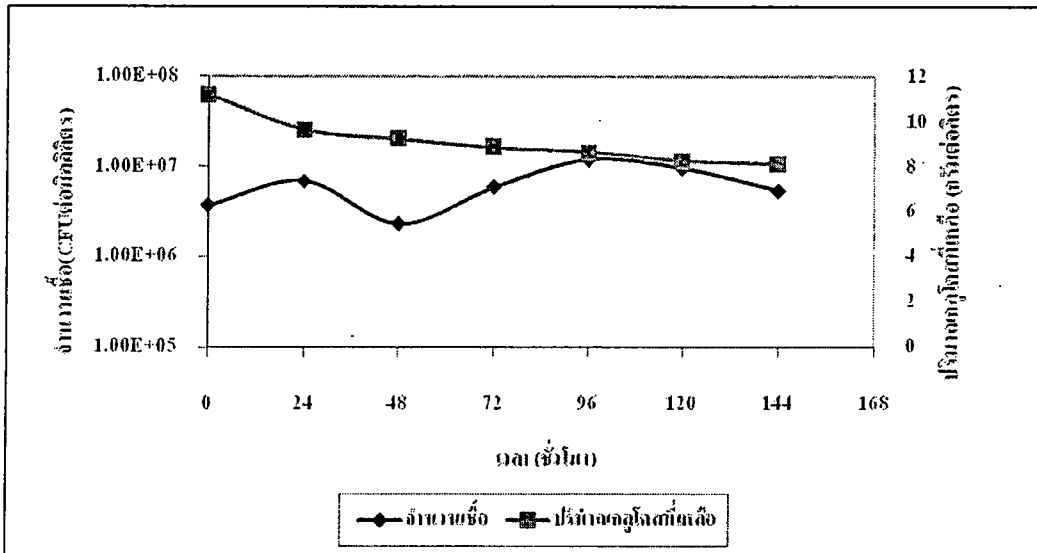
4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2

4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในพลาสติก

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษากการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยเริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารเหลว Reinforce clostridial ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยบ่มไร้อากาศ (Anaerobic jar) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลว GYCC ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 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 เก็บส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ของ Miller ส่วนใสที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิเรตด้วยเครื่อง HPLC

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



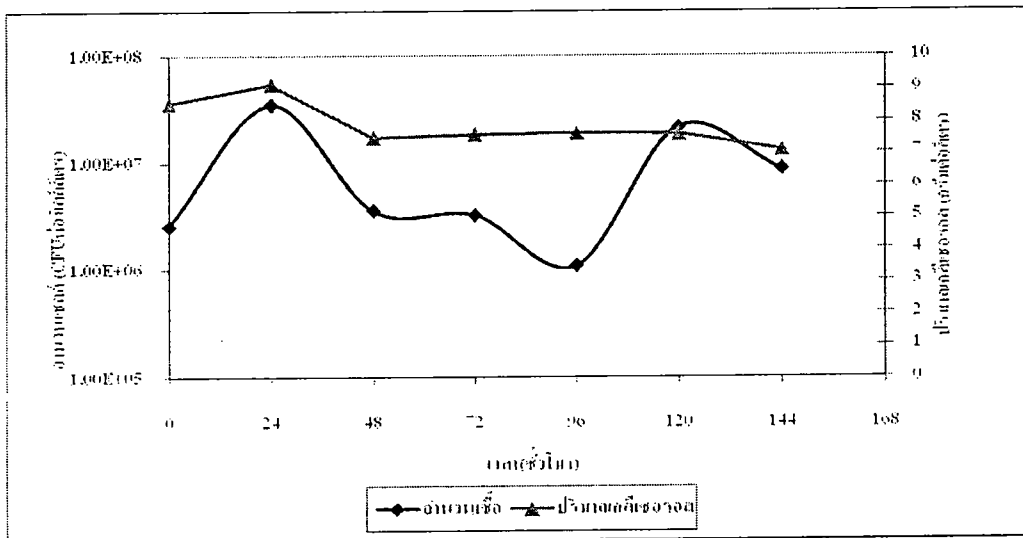
รูปที่ 4.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | จำนวนเซลล์ (CFU ต่อ มิลลิลิตร) | 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 | $(5.33 \pm 5.33 \times 10^6)^a$ | 8.10 |

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

นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี จากชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 3.70×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 6.88×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ต่อมาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตจะลดลงเล็กน้อยเป็น 2.32×10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 96 มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ที่ 1.20×10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร และลดลงจนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.33×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร 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) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆ ทั้งอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล



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

ตารางที่ 4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนี้

| 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 \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

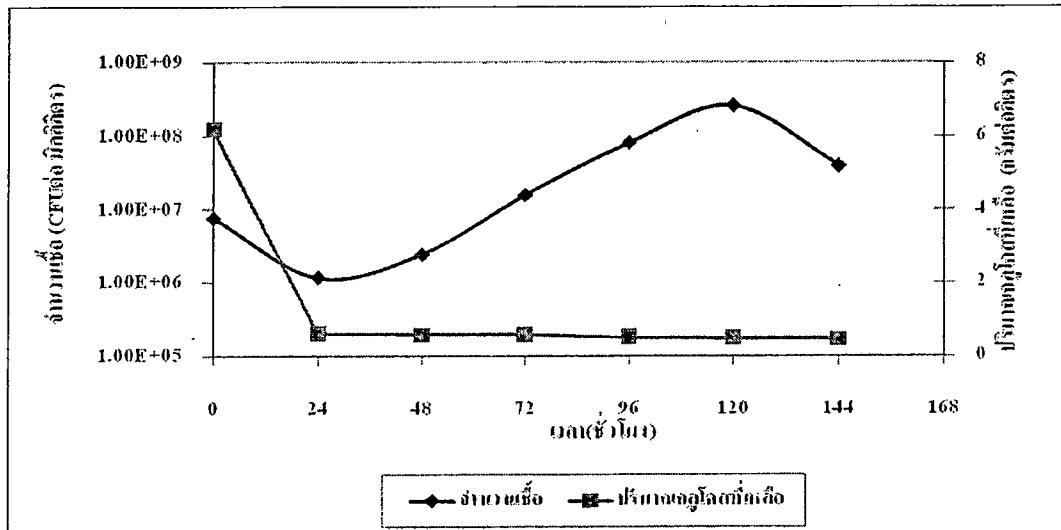
จากรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.7 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดนับได้ 3.47×10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร แต่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่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

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

เนื่องจากการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากันของเชื้อทั้ง 3 พลาสติก จึงได้มีการทดลองในระดับ ถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไร้ออกซิเจนแน่นอน โดยในขั้นแรกจะทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบพัด เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสกับที่ใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว และในขั้นตอนนี้ต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบพัดซึ่งมีอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ไบพัด

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



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

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

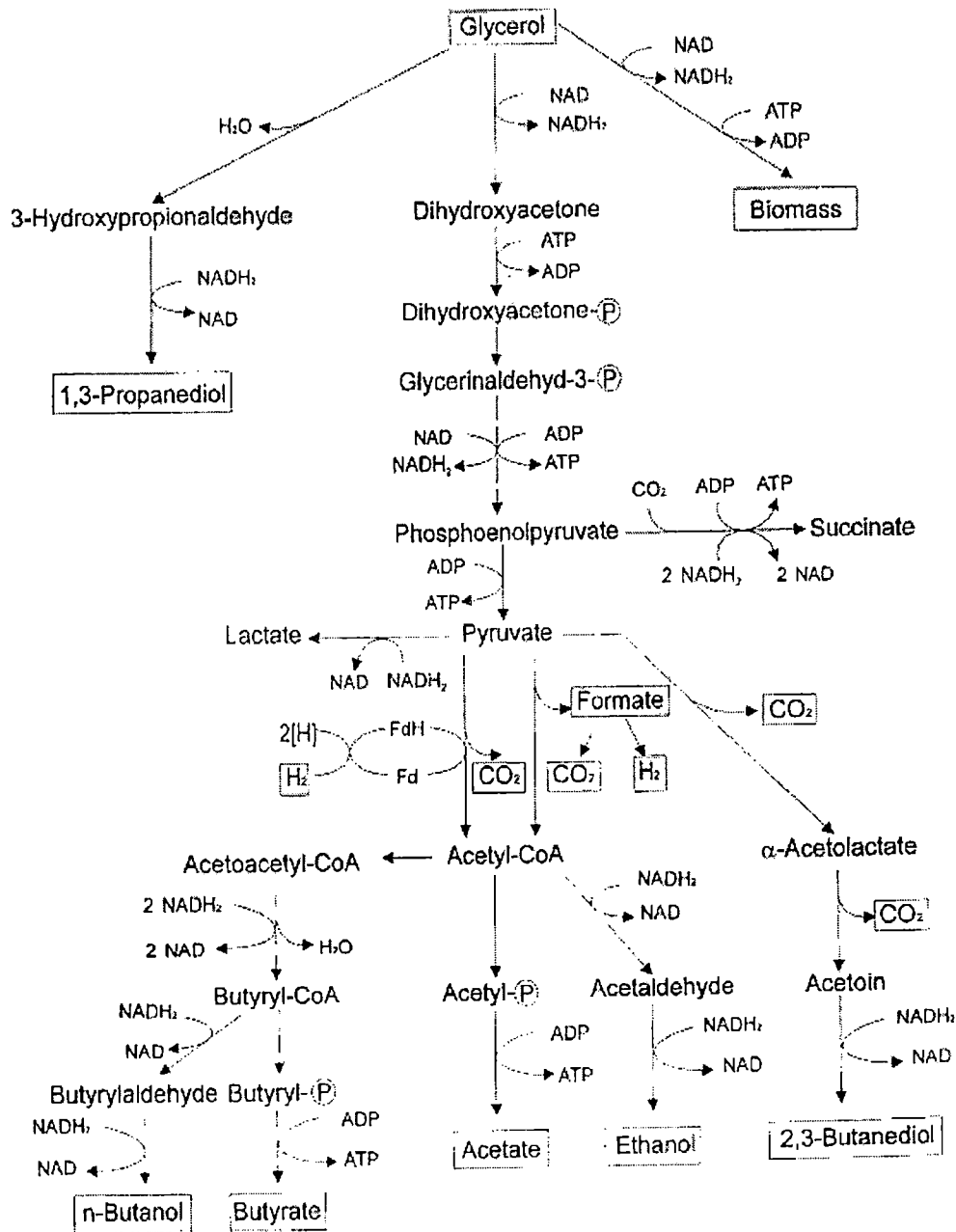
| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร) | ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) | ค่าพีเอช |
|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------|
| 0 | $(7.57 \pm 0.27 \times 10^6)^c$ | 6.18 | 6.00 |
| 24 | $(1.16 \pm 0.38 \times 10^6)^c$ | 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 \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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 พีเอช (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

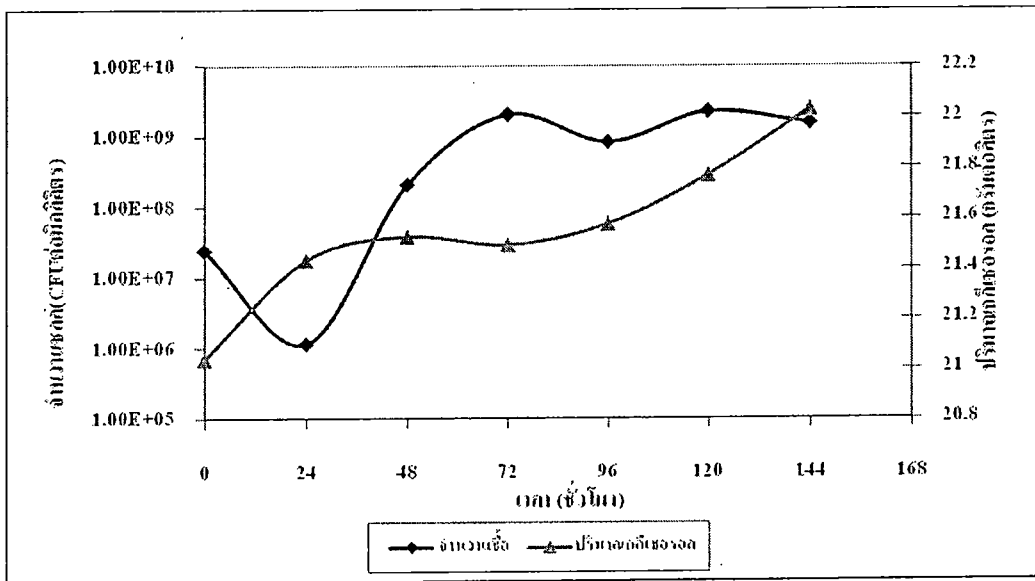
ผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคส มีการผลิตเอทานอล 0.180 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นหนึ่งในสามผลิตภัณฑ์หลักที่ประกอบไปด้วยอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและ 1,3-โพรเพนไดออล 0.031 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้จากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทีเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัดนั้น พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตลดลงเหมือนกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 4.43×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 0 ไปเป็น 1.16×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์กลับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.24×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อทำการสังเกตที่ค่าพีเอช (pH) พบว่า ค่าพีเอช (pH) ที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.67 และเพิ่มขึ้นเป็น 6.98 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 พีเอช (pH) มีค่าลดลง แสดงว่ามีการสร้างกรดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 4.6 วิธีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทีเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม

ที่มา : Biebl และคณะ (1999)



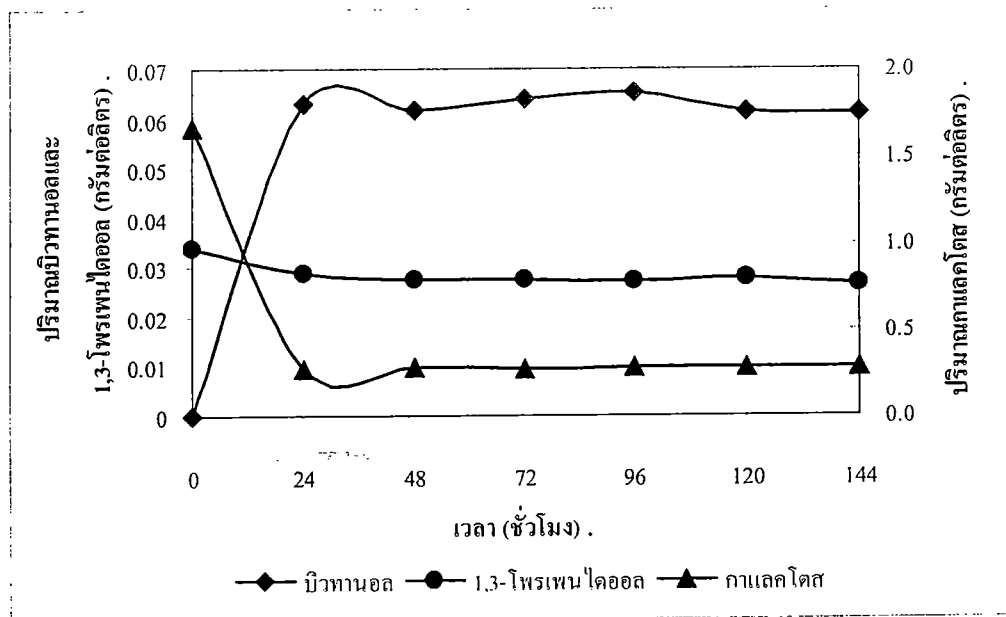
รูปที่ 4.7 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณแก๊สที่ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบปัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณแก๊สที่ผลิต)

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | จำนวนเซลล์ (CFU ต่อ มิลลิตร) | 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 \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อพิจารณาผลความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์จากรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.10 จะพบบิวทานอลเฉลี่ยประมาณ 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 144 นอกจากนี้ยังพบ 1,3-โพรเพนไดคอลเฉลี่ยประมาณ 0.029 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในเมตาบอไลซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทริเดีย ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และยังพบกาแลคโตสซึ่งมีปริมาณลดลงจาก 1.662 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเหลือเป็นประมาณ 0.275 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงและมีปริมาณคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเจริญเติบโตและการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้ออาจมาจากกาแลคโตสในเคซีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร GYCC



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

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 ซึ่งมีการเจริญลดลงจาก 3.66×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เป็น 2.16×10^5 CFU ต่อ มิลลิลิตร และมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.68 เป็น 4.87 ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคุมไปกับปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน จนมีค่าความเข้มข้นเหลือเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร แต่ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อไม่สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.84 และในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.71×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีน้อย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชั่วโมงที่ 96 และ 120 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

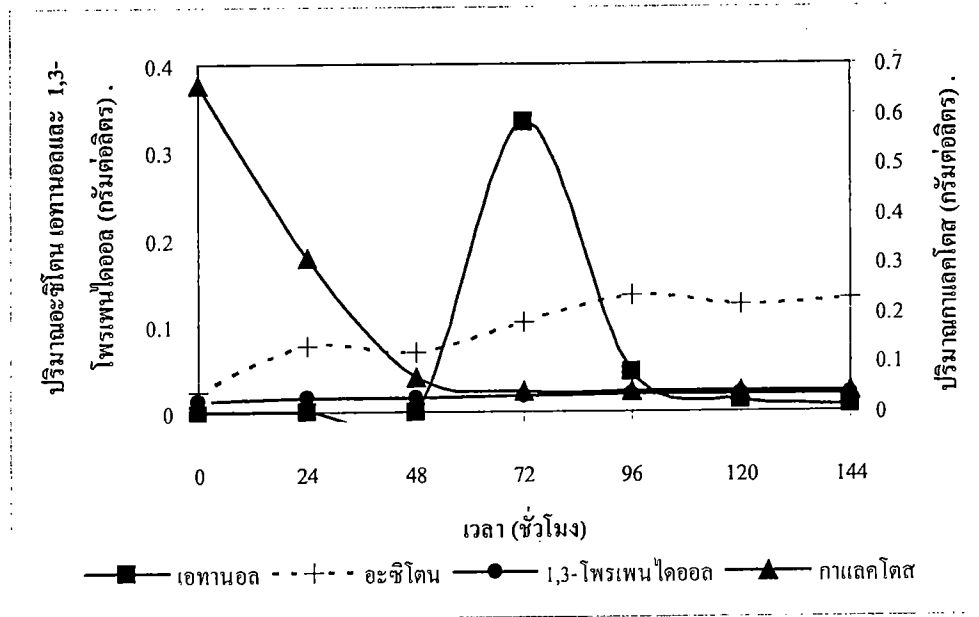
นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ จนถึงชั่วโมงที่ 144 เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

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 | $(3.66 \pm 5.80 \times 10^6)^b$ | 6.267 | 6.68 |
| 24 | $(2.16 \pm 0.67 \times 10^6)^b$ | 1.500 | 4.87 |
| 48 | $(1.26 \pm 1.32 \times 10^7)^b$ | 0.702 | 4.82 |
| 72 | $(2.19 \pm 0.56 \times 10^7)^{ab}$ | 0.677 | 4.83 |
| 96 | $(5.73 \pm 5.34 \times 10^7)^a$ | 0.674 | 4.84 |
| 120 | $(1.71 \pm 0.94 \times 10^7)^{ab}$ | 0.670 | 4.84 |
| 144 | $(2.85 \pm 4.59 \times 10^7)^{ab}$ | 0.668 | 4.85 |

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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



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

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

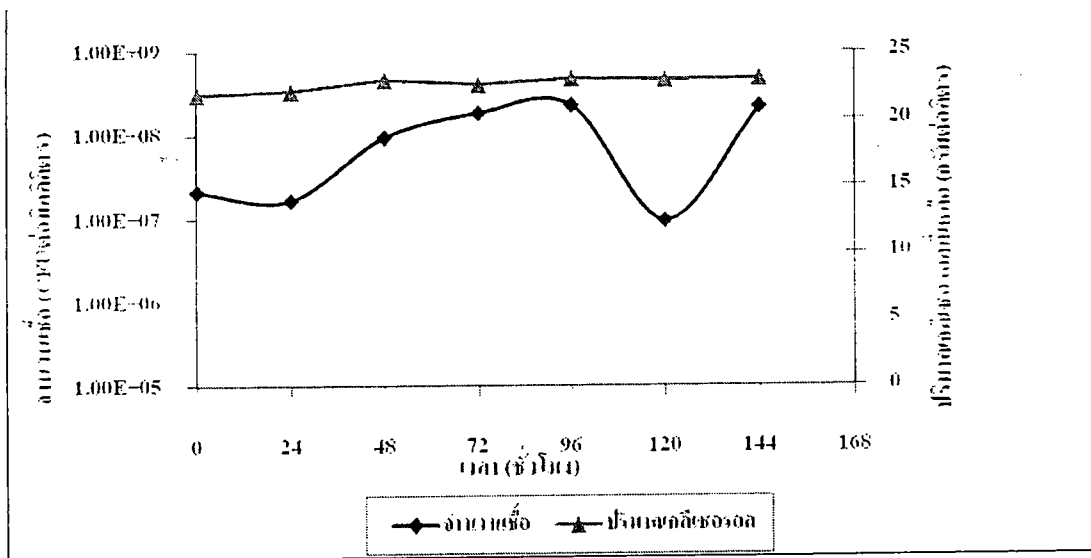
| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณอะซิโตน (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร) |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| 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 ในแถวแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถึงหมักขนาด 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



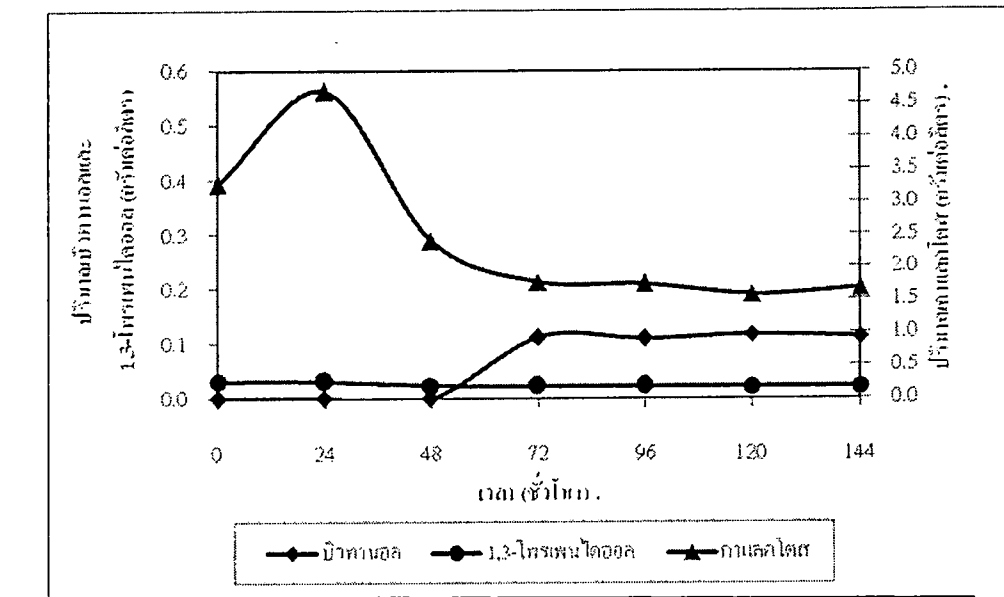
รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร) | ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร) | ค่าพีเอช |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------|
| 0 | $(2.11 \pm 0.38 \times 10^7)^c$ | $(21.83 \pm 0.05)^d$ | 6.68 |
| 24 | $(1.65 \pm 0.29 \times 10^7)^c$ | $(22.05 \pm 0.05)^c$ | 6.44 |
| 48 | $(9.38 \pm 8.66 \times 10^7)^{bc}$ | $(22.88 \pm 0.17)^a$ | 6.98 |
| 72 | $(1.83 \pm 0.95 \times 10^8)^{ab}$ | $(22.54 \pm 0.11)^b$ | 6.98 |
| 96 | $(2.30 \pm 0.40 \times 10^8)^a$ | $(22.97 \pm 0.08)^a$ | 6.90 |
| 120 | $(9.55 \pm 9.12 \times 10^6)^c$ | $(22.90 \pm 0.01)^a$ | 6.90 |
| 144 | $(2.17 \pm 0.31 \times 10^8)^a$ | $(22.99 \pm 0.09)^a$ | 6.98 |

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

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบ ใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารสูตร GYCC พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 2.25×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อมีจำนวนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.13 ส่วนค่าพีเอช (pH) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดการเพาะเลี้ยง



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

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ไบพัด 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

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC เริ่มพบบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงเข้มข้น 0.027 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นเป็น 0.112 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบเอทานอล และอะซิโตน ซึ่งจำนวนเชื้อที่มีชีวิตและปริมาณบิวทานอลมีแนวโน้มสอดคล้องไปกับการใช้น้ำตาลกลูโคส ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3.272 กรัมต่อลิตรลดลงเป็น 1.753 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล เหลือเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

4.3.1 *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษากการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 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} และ 10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อ มิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.12

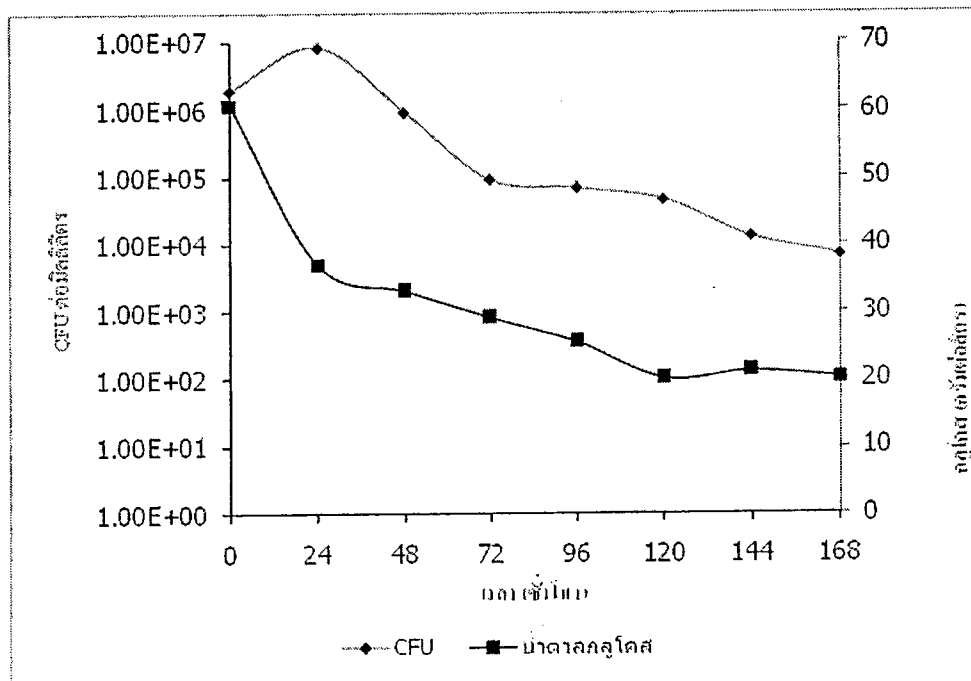
จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.12 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 เริ่มต้นนับได้ 1.96×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 8.38×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น เมื่อเวลาผ่านไปจนจบการเพาะเลี้ยงที่ 168 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงเรื่อยๆ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



รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิเมตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารอุดม P2

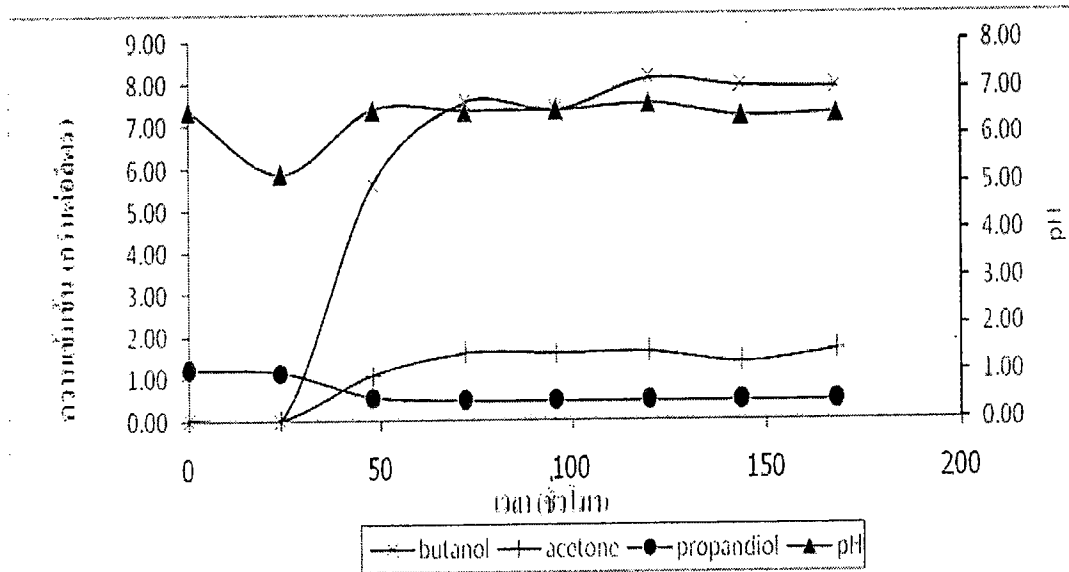
เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.13 ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่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

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | pH | ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณ 1,3-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



รูปที่ 4.13 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (x) อะซีโตน (+) 1,3 โพรเพนไดออล (●) และค่าความเป็นกรดต่าง (▲) 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 วิธีการทดลองแบบเดียวกันเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อ มิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.14

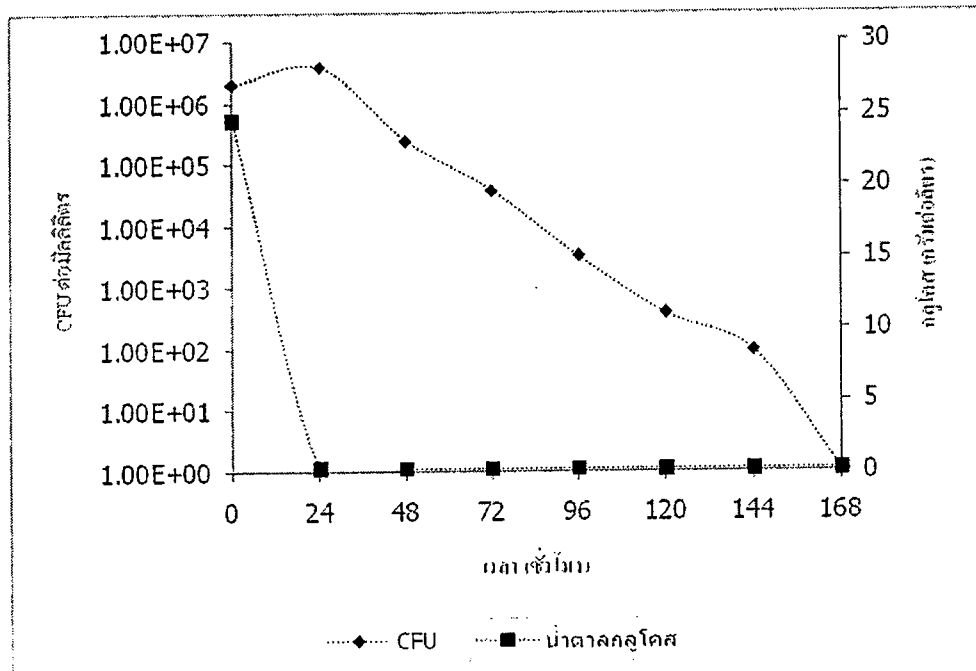
ตารางที่ 4.17 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

| 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 \pm 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 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับسترหรือน้ำตาลกลูโคส พบว่าการลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 0.27 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณตามตารางที่ 4.2 แล้วมีเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้ไป 24.27 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง แทบไม่เหลือน้ำตาลในระบบเลย



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อ มิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

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

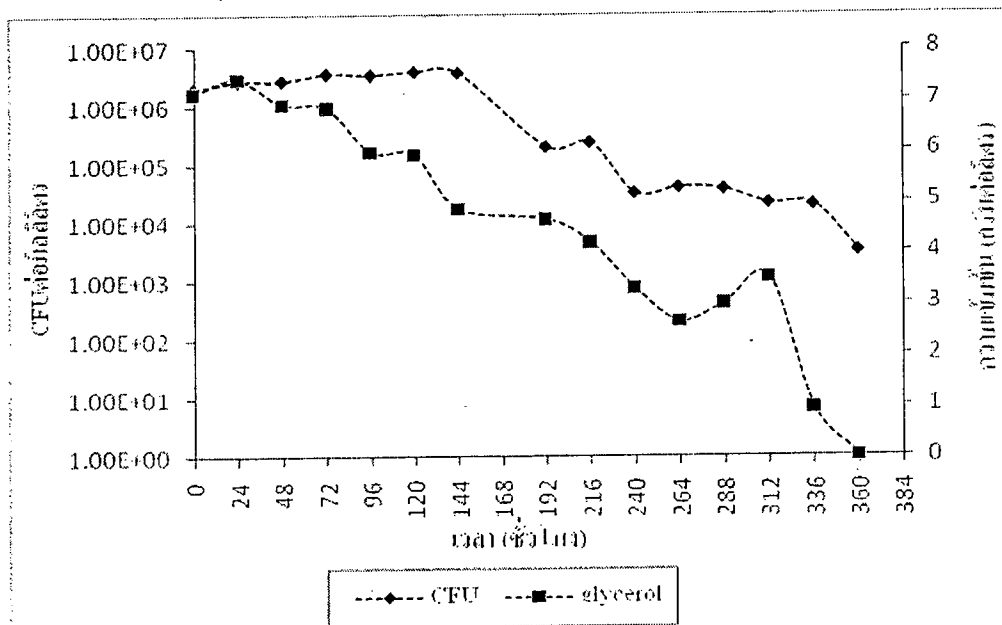
เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.15 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.09×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร จากนั้นที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้น ในเวลา 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 และ 360 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีการลดจำนวนลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท ซึ่งก็

คือกลีเซอรอล ปริมาณกลีเซอรอลลดลงอย่างช้าๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยในชั่วโมงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 360 กลีเซอรอลถูกใช้ไปจนหมด

ตารางที่ 4.18 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิตร) | ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร) |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 0 | $(2.09 \pm 0.12 \times 10^6)^c$ | 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 \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในงานเพาะเลี้ยง (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

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อ

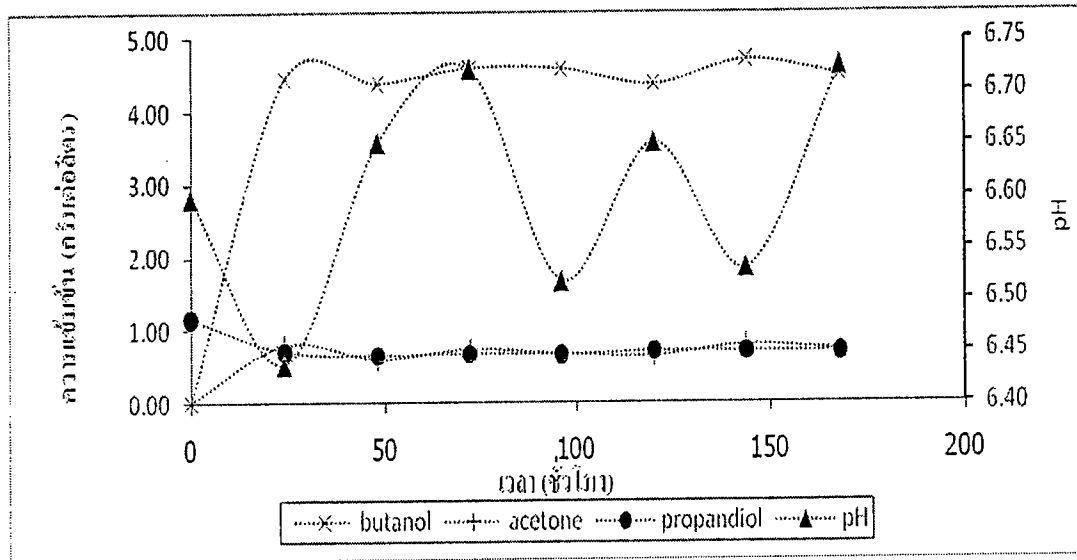
ลิตร์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร์ ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.19 กับ 4.20 และรูปที่ 4.16 กับ 4.17 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *C. beijerinckii* สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตร์ที่ชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตร์ที่ชั่วโมงที่ 144 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดคอลสูงสุด 1.15 กรัมต่อลิตร์ที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้อาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตร์ที่ชั่วโมง 312 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดคอลสูงสุด 1.57 กรัมต่อลิตร์ที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 2 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร์เป็นแหล่งคาร์บอน

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | pH | ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร์) | ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร์) | ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดคอล (กรัมต่อลิตร์) |
|-------------------------------|------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| 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 c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.16 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—x—) อะซีโตน (—+—) 1,3 โพรเพนไดอล (—●—) และค่าความเป็นกรดต่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

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

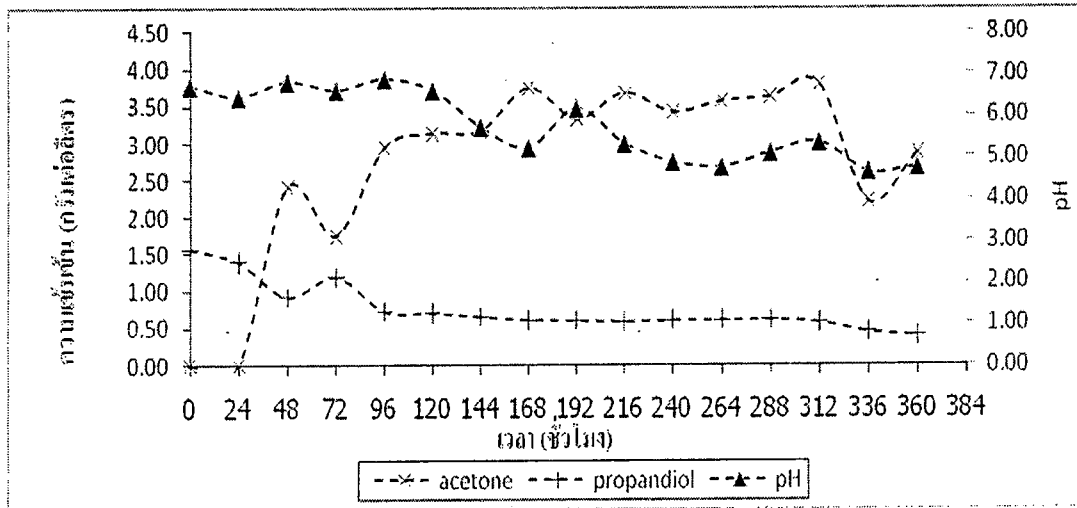
| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | pH | ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณ 1,3 โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร) |
|-------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0 | 6.70 | 0 ^c | 1.57 ± 0.01 ^a |
| 24 | 6.44 | 0 ^c | 1.39 ± 0.01 ^b |
| 48 | 6.80 | 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 |

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

| เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง) | pH | ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณ 1,3 โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร) |
|----------------------------------|------|--------------------------------|---|
| 120 | 6.60 | 3.13 ± 0.14^{abc} | 0.70 ± 0.05^c |
| 144 | 5.72 | 3.17 ± 0.15^{abc} | 0.65 ± 0.03^{cf} |
| 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 g ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.17 ปริมาณความเข้มข้นของอะซิโตน (---x---) 1,3 โพรเพนไดออล (---+---) และค่าความเป็นกรดต่าง (---▲---) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรายงานของ Fermanek และคณะ (1997) พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซิโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ของมอลโตเดรีกซ์ติน (maltodextrin) หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Qureshi และคณะ (2008) พบว่าเมื่อเติมกลูโคสปริมาณ 58.8 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 จะสามารถผลิตอะซิโตนได้ 5.44 กรัมต่อลิตร บิวทานอลเป็น 15.21 กรัมต่อลิตร และเอทานอลเป็น 0.41 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักกลูโคสจะถูกใช้ไป 51.4 กรัมต่อลิตร ภายหลังปริมาณกลูโคสจะเหลือเท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

5.1.1 สรุปผลวิจัยของจีโนส *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 พบซอร์บิทอลซึ่งมีค่าคงที่ประมาณ 0.53 กรัมต่อลิตรในตัวอย่าง ซึ่งน่าจะเป็นสารปนเปื้อนในกลูโคส เพราะ จุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลเป็นแหล่งอาหารได้

5.1.2 สรุปผลวิจัยของจีโนส *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในสูตรอาหารที่ 2

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

CFUต่อมิลลิลิตร แปรผันกันกับปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ ในช่วงเวลาที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลือเท่ากับ 8.10 กรัมต่อลิตร และการทดลองที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในช่วงเวลาที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 3.47×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณกลีเซอรอลแปรผกผันกับจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ใช้ปริมาณ กลีเซอรอลไป 1.45 กรัมต่อลิตร จากช่วงเวลาที่ 0 เท่ากับ 8.52 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 7.07 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลาที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลีเซอรอล เพราะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้

การศึกษากระบวนการหมักและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้กลูโคสและ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าช่วงเวลาที่ 24 เชื้อมีจำนวนลดลงจากช่วงเวลาที่ 0 มีปริมาณเชื้อ 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตรเป็น 1.16×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากเชื้อต้องมีการปรับตัวจาก Innoculum คู่สภาวะในถังหมักเชื้อจึงมีจำนวนลดลง จากนั้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดในช่วงเวลาที่ 96 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.03×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อและบ่งชี้ได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารผลิตภัณฑ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล และเอทานอล ในช่วงเวลาที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.180 และ 0.031 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น การเจริญของเชื้อมีลักษณะคล้ายกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อมีการผลิตบิวทานอลในช่วงเวลาที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ผลิตได้เท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรและผลิต โพรเพนไดออลในช่วงเวลาที่ 0 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.029 กรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของเชื้อจากช่วงเวลาที่ 0 เข้าสู่ช่วงเวลาที่ 24 มีการเจริญเติบโตลดลงซึ่งขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไปถึงช่วงเวลาที่ 96 จำนวนเชื้อมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^7 CFUต่อมิลลิลิตรและในช่วงเวลาที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตบิวทานอลแต่มีการผลิต อะซิโตนในช่วงเวลาที่ 0 ปริมาณเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรและเอทานอลในช่วงเวลาที่ 72 ปริมาณเท่ากับ 0.333 กรัมต่อลิตร ปริมาณของเอทานอลลดลงเนื่องจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมี

ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 2.25×10^7 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 สรุปผลวิจัยของจีโนส *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 8.33×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร ส่วนในการทดลองการเปรียบเทียบในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรกับการใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหาร พบว่าในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.93×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 168 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.78×10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคือ 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

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย มีข้อเสนอแนะในการทดลองดังต่อไปนี้

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

เอกสารอ้างอิง

- กองบรรณาธิการวารสารเมืองปศุสัตว์. 2549. ระบบไบโอแก๊สในฟาร์มสุกร. *วารสารเมืองปศุสัตว์*.
หน้า 12-16.
- จिरกานต์ เมื่อนาโพธิ์. 2009. การวิจัยพัฒนา เทคโนโลยีการผลิต N-butanol จากวัสดุทางการเกษตร
เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- จिरกานต์ เมื่อนาโพธิ์, เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และพุลพร แสงบางปลา. 2544. รายงาน
โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต n-butanol จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็น
เชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน.ทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- จिरกานต์ เมื่อนาโพธิ์, สุวัฒนา พวงเพิกสีก, วรพัฒน์ อรรถยุกติ, ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ. 2009.
กระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล จากมันสำปะหลัง. โครงการวิจัย. จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์ : เลขที่ 91-IR-2527
- จริยา ชมวารินทร์, กัญญาลักษณ์ ชัยคำภา, นเรศ วโรภาสตระกูล. 2541. แบคทีเรียวิทยาพื้นฐาน.
ภาคจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- เดลินเดข พิศาสรี. 2549. ก๊าซชีวภาพ. ศูนย์ส่งเสริมพลังงานชีวมวล มูลนิธิพลังงานเพื่อสิ่งแวดล้อม
หน้า 12-15.
- ชัชวาล คำวงศ์, ณัฐวิทย์ พงศ์พันธุ์, นฤตกิจ พูนกาศ, วิลาวัลย์ ปันอิน, วิไลวรรณ สีนะกุล. 2552.
แอลกอฮอล์. โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผน
ยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถาบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นवलจันทร์ ข้องสาย, สุวิญา เหลืองวีรชัย. 2548. โครงการพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพเรื่อง
การศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากน้ำคั้นลำต้นข้างฟางหวานโดย
Clostridium acetobutylicum TISR 1462. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พัฒนา เหล่าไพบูลย์, ลักษณะ เหล่าไพบูลย์, วิชัย สิวาวัชรมาศ, ประสิทธิ์ ใจศีล. 2549. การผลิตบิว-
ทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ด้วยวิธีการหมักแบบ
กะ และกึ่งกะ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาค คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มณีนาถ สีนุดพงษ์. 2527. อิทธิพลของการเติมบิวทานอลและกรดบิวทีริกที่มีผลต่อการเจริญเติบโต
ของคลอสตริเดียมที่แยกได้จากดินในประเทศไทย. ปัญหาพิเศษของนักศึกษาเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 121 ตอนที่ 21 ง (11 มี.ค.47) หน้า 7-13 (เอกสารภาษาไทย ชั้น 5)
- มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรินบริสุทธิ์ มอก. 377-2538 (2538)
- รติกร พิทักษ์นเรศพร, รัตน์มา คงคาทิพย์, ชุตติมา นันทเสนา. 2552. การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*. โครงการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- วิชัย สีสาวรมาศ, ลักขณา เหล่าไพบุลย์ และประสิทธิ์ ใจคิด. 2548. คณะเทคโนโลยี การศึกษา การผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinckii*
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือกรุงเทพ.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. จุลอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. หน้า 93-110.
- สมชัย จันทร์สว่าง. 2550. รายงานวิจัยเรื่องเทคโนโลยีแก๊สชีวภาพ ภาควิชาสัตว์บาล 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 ส่วยสม. 2550. ระบบบำบัดน้ำเสียแบบยูเอสบี. 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.

- 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., Blaschek 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.

- Hugh AG., Chen JS. 1983. Acidic conditions 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. *Microbiological 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.

- 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, Petidemange, 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 fermentation. 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 Bioenergy* 17, 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.

- 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 acetobutylicum* 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., Ishizaki 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.

- 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: ภาณุชนาถ 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](http://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)

- [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/สรุปศักดิ์.pdf (25/03/2554)
- [Online]. Available: http://pikul.lib.ku.ac.th/cgi-bin/agre.exe?rec_id=000221&database=agre&search_type=link&table=mona&back_path=/agre/mona&lang=thai&format_name=TFM
ON (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=all&topic=668&page=1> (20/09/2553)

[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)

ภาคผนวก ก

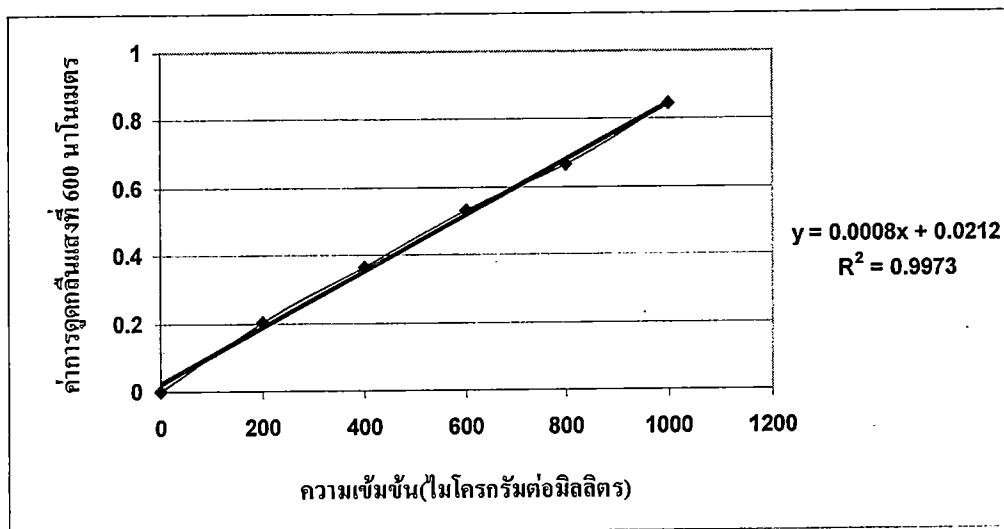
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

กราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐานเตรียมได้ดังนี้ นำน้ำตาลกลูโคสไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเป็นสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมได้มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Dinitrosalicylic 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 ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลอสก์

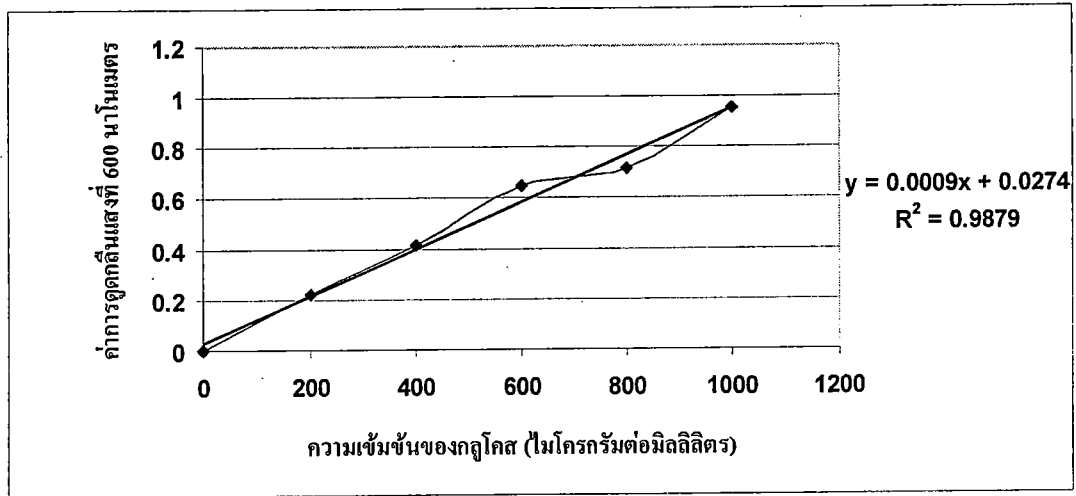
| ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสง |
|---|------------------|
| 0 | 0 |
| 200 | 0.202 |
| 400 | 0.364 |
| 600 | 0.530 |
| 800 | 0.666 |
| 1000 | 0.846 |



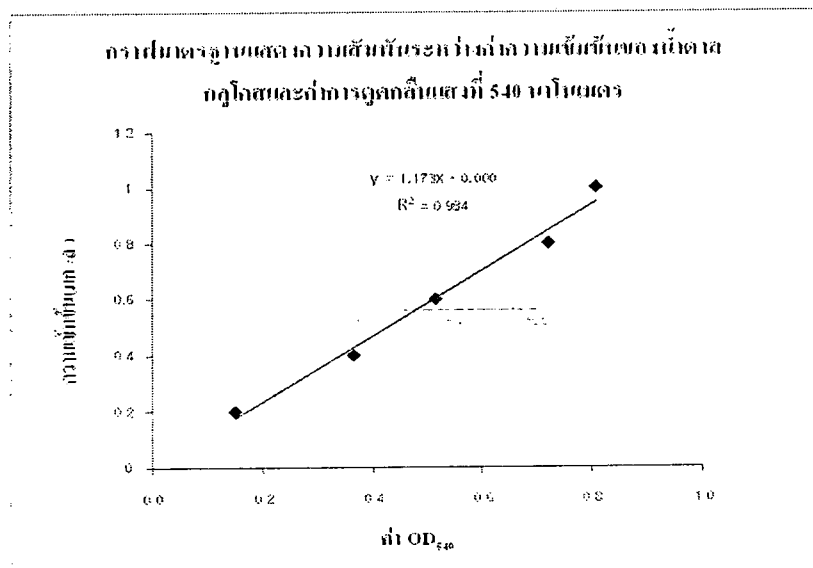
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลอสก์

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบดั่งหมักขนาด 2 ลิตร

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

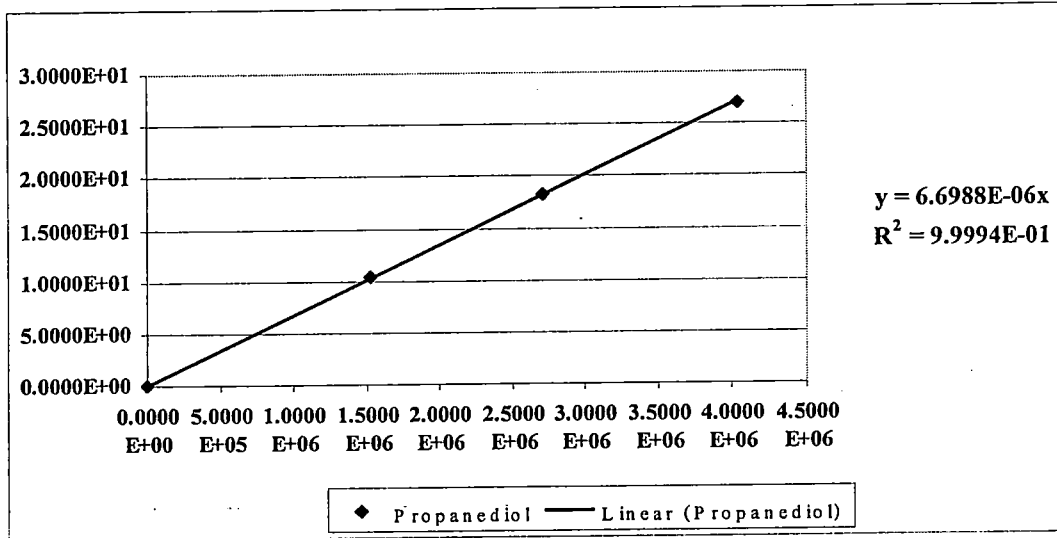


รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium acetobutylicum* ในการเพาะเลี้ยงแบบถึงหมักขนาด 2 ลิตร

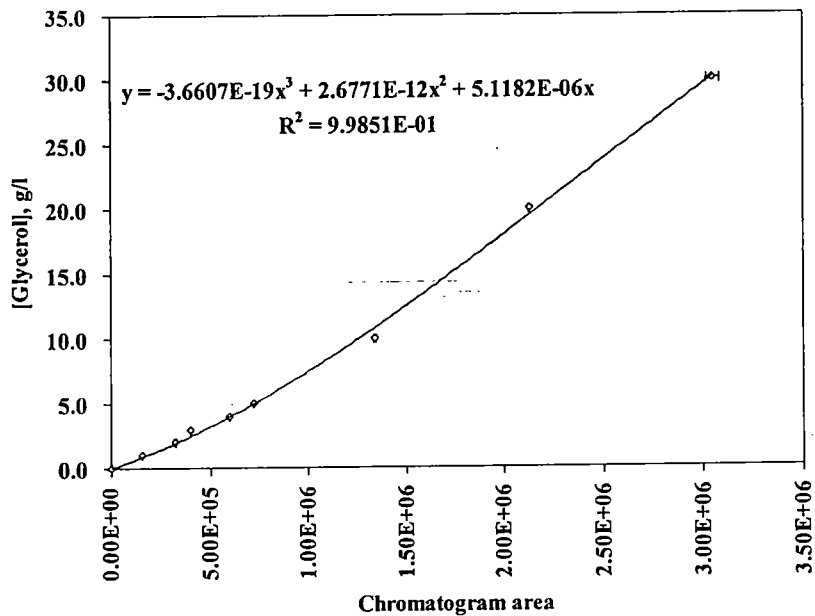


รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium beijerinckii*

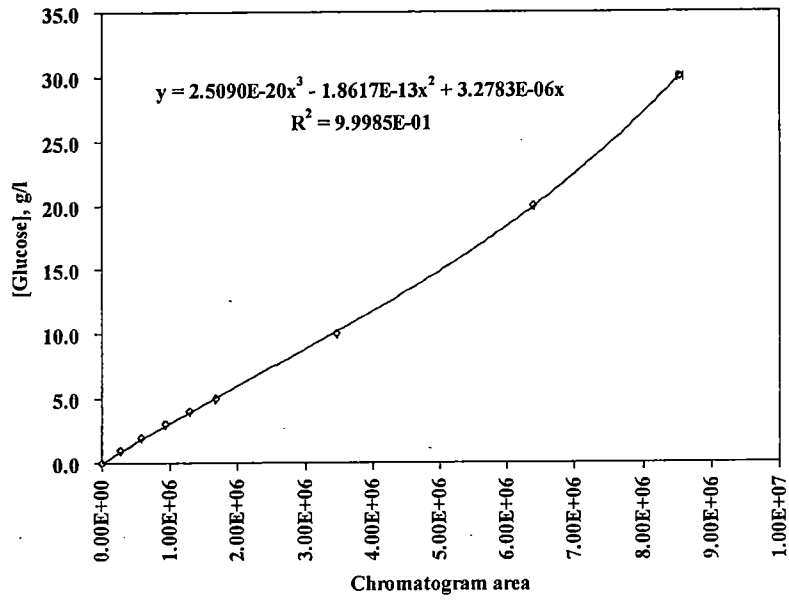
กราฟมาตรฐานของสารต่างๆ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



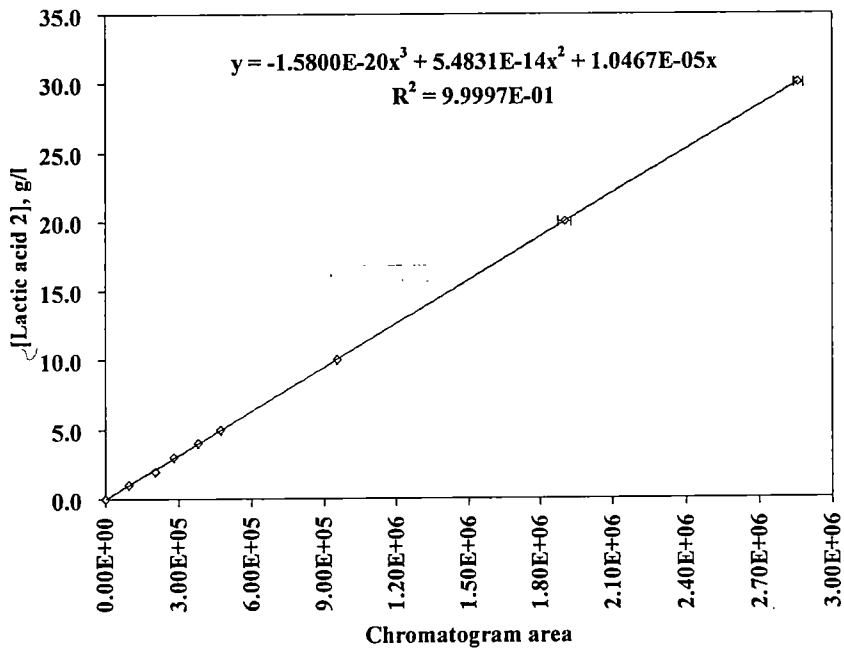
รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของ 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC



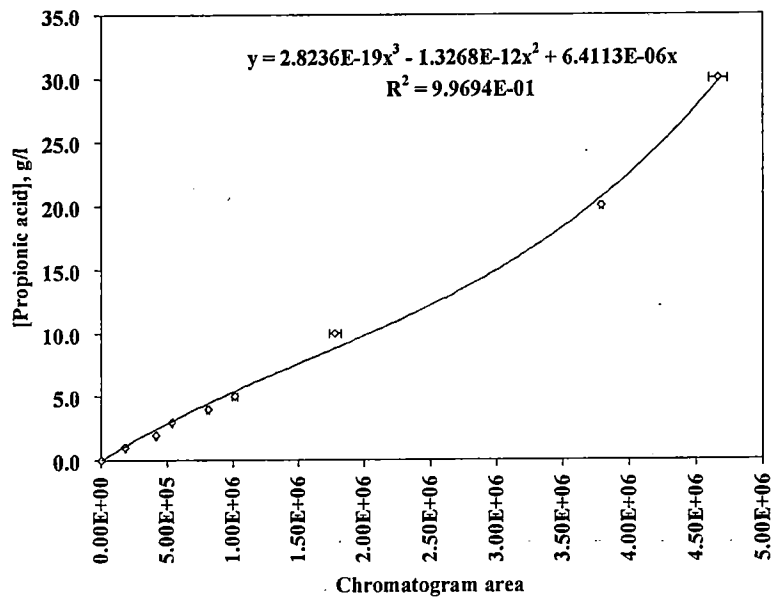
รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



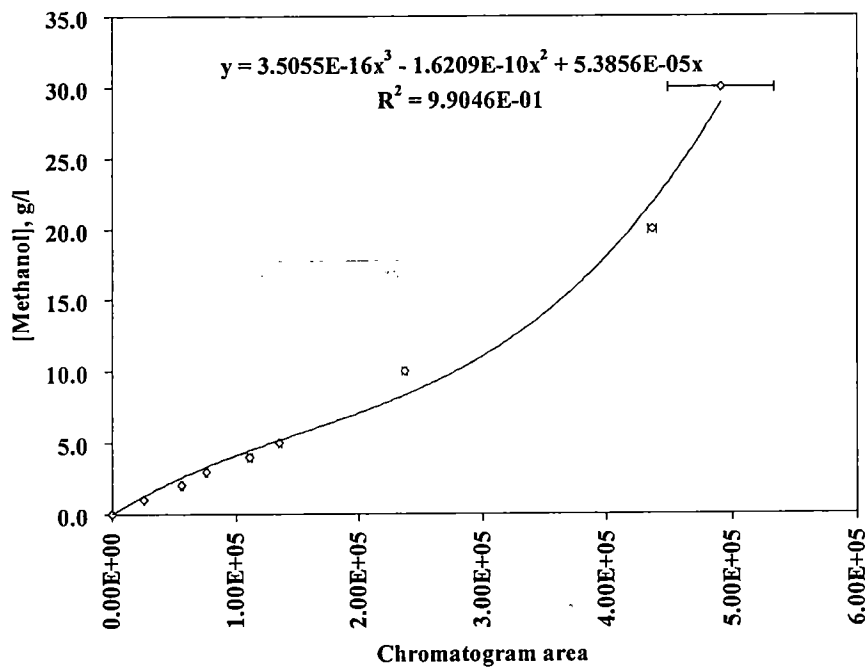
รูปที่ 6.6 กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



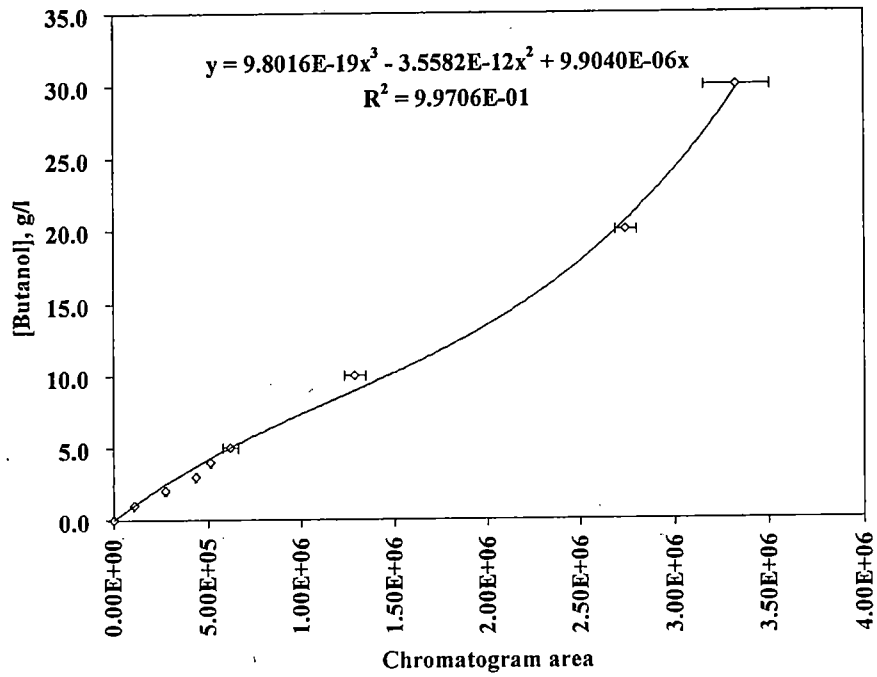
รูปที่ 6.7 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



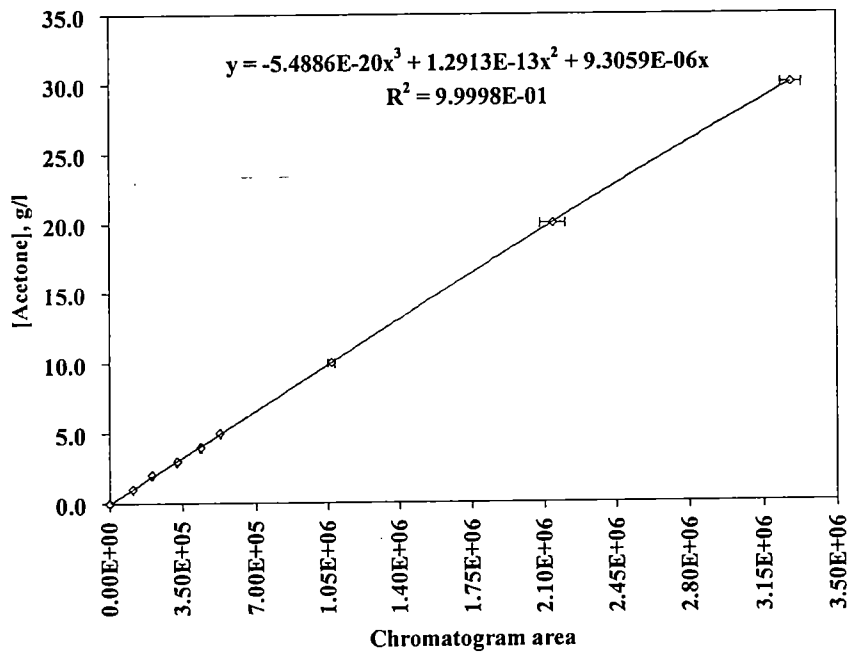
รูปที่ ๘.8 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาอโนคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



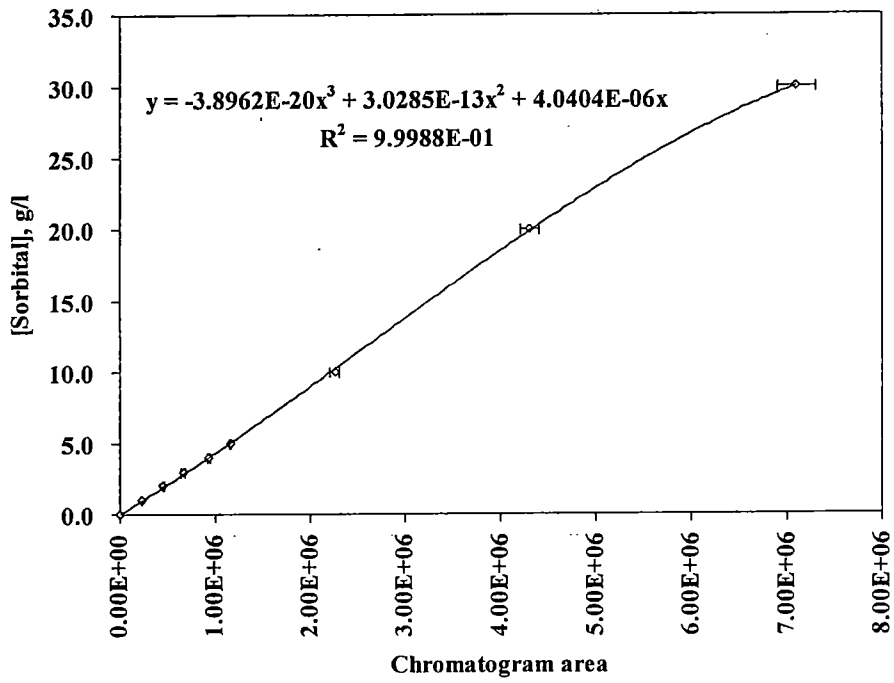
รูปที่ ๘.9 กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



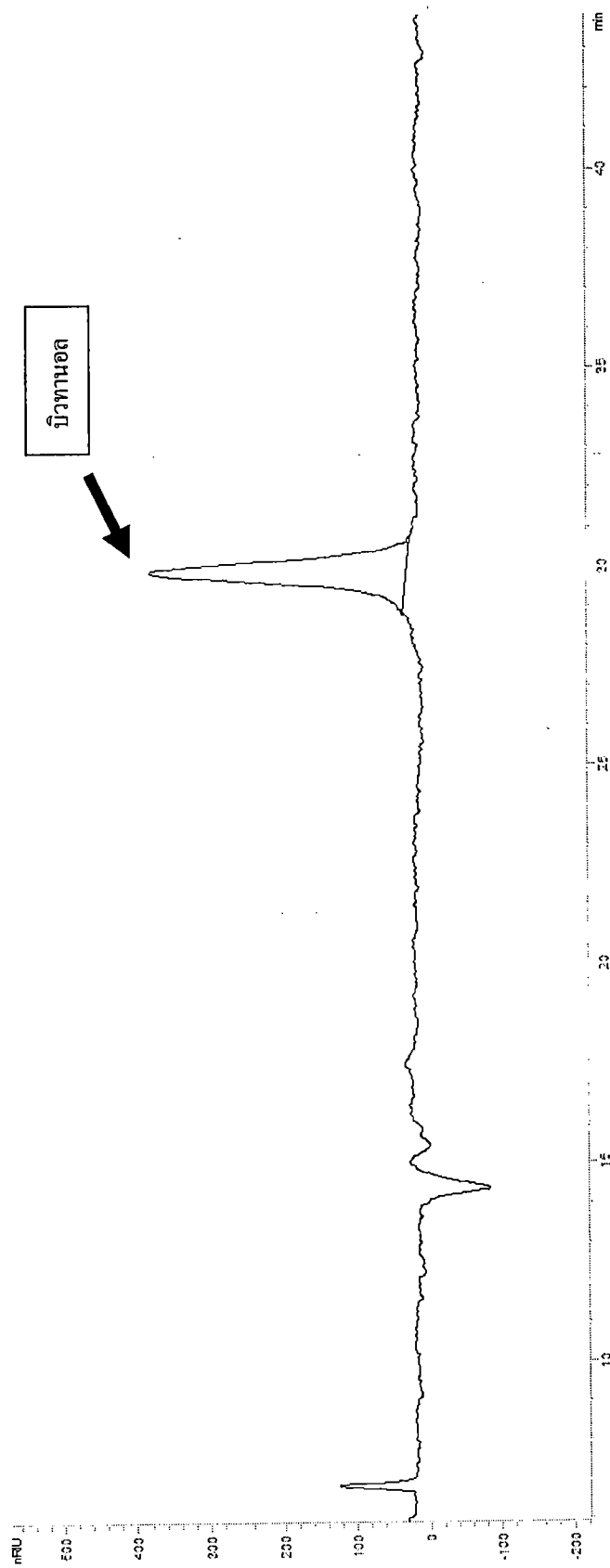
รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ ก.11 กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

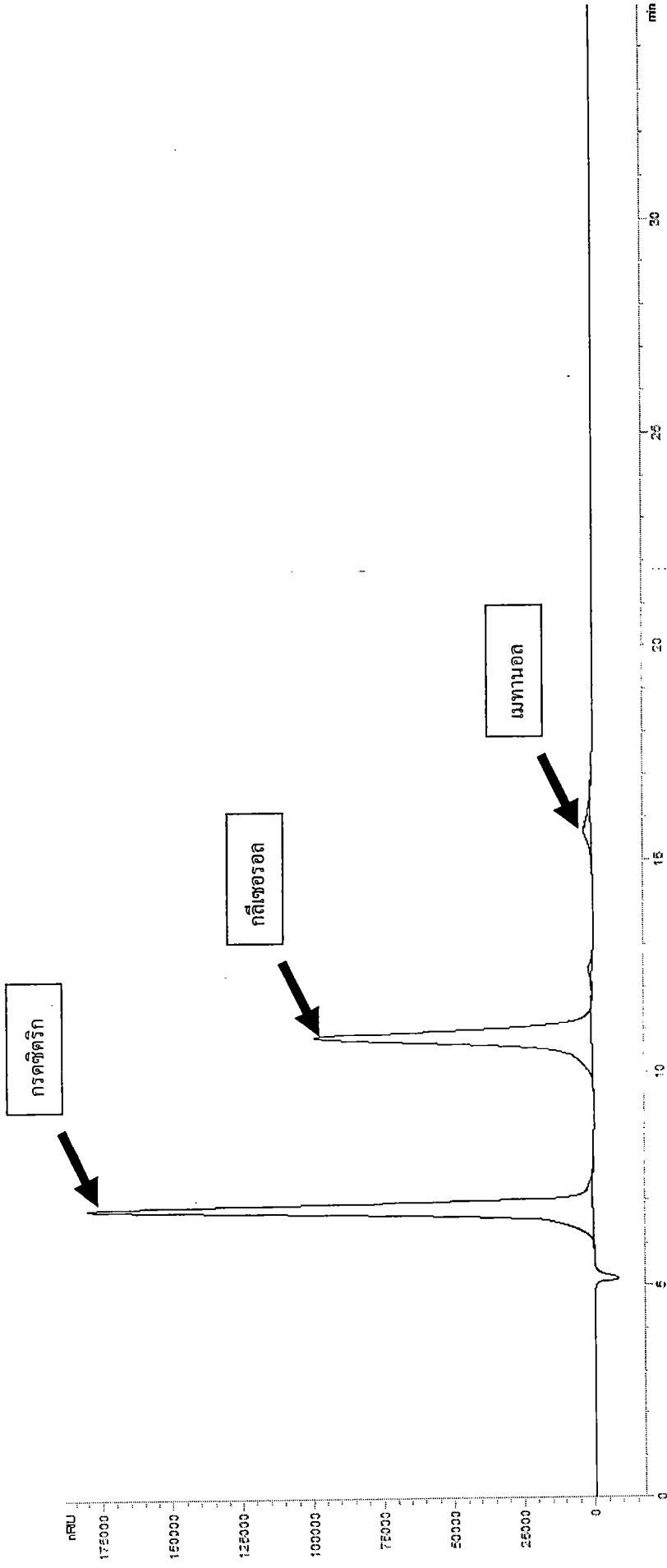


รูปที่ ก.12 กราฟมาตรฐานของซอร์บิทอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



(ก)

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



(ข)

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

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 |

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 |
|----------------|----|----------|----------------|------------|----------------------------------|----------|------------|------------|
| | | | | | -312925.7637 | 5.6263E6 | | |
| 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 |

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.

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 |

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.

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

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 |

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 |

ตารางที่ ๗.4 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

CFU/mL

Descriptives

| | 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 |

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.

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

| | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|-------------------|---|-------------------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| gly 30 g/L | | | |
| 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.

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

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 |

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.

2. *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสุตครั้งที่ 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} | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

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 | 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} | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

ตารางที่ ๗.9 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมัก ขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้สปัต

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} | | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน
 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบฟัด

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 | | | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
| | | 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. | | | | | |

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมัก ขนาด 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} | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน
 ในถังหมักขนาด 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} | | | | |
| treatment | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกัลลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกัลลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สถานะนิ่ง

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กรั่มต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | |
| gly | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

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. | | | | | |

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกิลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกิลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโอดี 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 | | | | | |
| Glycerol | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
| | | 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. | | | | | |

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้เบด

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 | | | | |
| Acetone | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

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

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กรัสมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | |
| Acetone | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มแข็งของบิวทานอล 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 | | | |
| butanol | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบปัด
ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กรรมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | |
| butanol | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

ตารางที่ ๔.20 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกัญโคตสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ไบปัด

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กัรมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | | |
| Ethanol | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
| | | 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. | | | | | |

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบปัด
อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กำรมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | |
| Ethanol | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพพรენไดออกส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่
ใช้ใบพัด

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 | | | |
| Propanedio I | 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. | | | |

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพน ไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีภูมิลักษณ์เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ไบโพด 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 | | | |
| Propanedio I | 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. | | | |

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพเพนไดออก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกิลีเซอร์อลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 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 | | | | | |
| Propanedio I | 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. | | | | | |

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกิลิเชอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 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 | | | | |
| Propanedio I | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในตั้งหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|-----|---------|---------|
| กรรมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | |
| Galactose | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.27 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้
ใบพัด อัดราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

| Descriptives | | | | | | | | | |
|--------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|--|
| กรรมต่อลิตร | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | |
| Galactose | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
| | | 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. | | | | |

ตารางที่ ข.28 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่

ใช้ใบพัด

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 | | | |
| Galactose | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

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 | | | |
| Galactose | N | Subset for alpha = 0.05 | |
| | | 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. | | | |

3. *Clostridium beijerinckii*

ตารางที่ ข.29 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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.

ตารางที่ ข.30 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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.

ตารางที่ ข.31 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

| 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 |

cell (CFU/ml)

ตารางที่ ข.31 (ต่อ) การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อ ลิตร

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.

ตารางที่ ข.32 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่หลอดเลือดตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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.

ตารางที่ ข.33 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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.

ตารางที่ ข.34 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกิลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกิลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

| Time | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|----------------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| glycerol (g/l) | | | | | | | | |
| 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

| Mean | 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.

ตารางที่ ข.35 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณชีวภาพของแบคทีเรียที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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 | 3 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| | 3 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| | 3 | 5.6100 | .54745 | .31607 | 4.2501 | 6.9699 | 4.98 | 5.97 |
| | 3 | 7.5533 | .39577 | .22850 | 6.5702 | 8.5365 | 7.31 | 8.01 |
| | 3 | 7.3767 | .21595 | .12468 | 6.8402 | 7.9131 | 7.15 | 7.58 |
| | 3 | 8.1167 | .64856 | .37445 | 6.5055 | 9.7278 | 7.37 | 8.54 |
| | 3 | 7.9433 | .63011 | .36379 | 6.3781 | 9.5086 | 7.44 | 8.65 |
| | 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 | 3 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| | 3 | .0000 | .00000 | .00000 | .0000 | .0000 | .00 | .00 |
| | 3 | 1.0727 | .22830 | .13181 | .5055 | 1.6398 | .83 | 1.28 |
| | 3 | 1.5900 | .16462 | .09504 | 1.1811 | 1.9989 | 1.40 | 1.69 |

ตารางที่ ข.35 (ต่อ) การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณชีวภาพและอะซิติลที่ผลิตได้ในกาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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

| Mean | 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.

acetone

Duncan^a

| Mean | 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 beijerinckii* 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 |

ตารางที่ ข.36 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซิโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* 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 | | |
| 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 | | | |

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

butanol

Duncan^a

| Mean | 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

| Mean | 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.