การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

Production of Biobutanol Using *Clostridium acetobutylicum*

กฤศกา อินทรสุวรรณ

นัฏรุจี หมีนพราน

บุษบงษ์ พลเยี่ยม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF BIOBUTANOL USING *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

KISSAKA INTARASUWAN

NATRUGEE MEENPRAN

BUDSABONG PONYIUM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
	Production of Biobutanol Using *Clostridium acetobutylicum*
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกฤศกา อินทรสุวรรณ
	นางสาวนัฏรุจี หมีนพราน
	นางสาวบุษบงษ์ พลเยี่ยม
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	
กรรมการ	ผศ. ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

Production of Biobutanol Using *Clostridium acetobutylicum*

ชื่อนักศึกษา นางสาวกฤศกา อินทรสุวรรณ

นางสาวนัฏรุจี หมีนพราน

นางสาวบุษบงษ์ พลเยี่ยม

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2553

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ที่มีกลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบทั้งการเจริญและการผลิตบิวทานอลของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้ 2 สภาวะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในฟลาสก์สภาวะนิ่งและในถังหมักขนาด 2 ลิตรสภาวะไม่ใช้ใบพัดและใช้ใบพัดด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักที่ไม่มีการใช้ใบพัด โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.24 $\pm 0.17 \times 10^9$ CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของกระบวนการหมัก ค่าพีเอช (pH) ของเวลาเริ่มต้นจาก 6.76 ลดลงเหลือ 5.98 หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 72 ชั่วโมง จากนั้น ค่าพีเอช มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 6.04-6.06 จนจบการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงสภาวะเดียวกันนี้ ยังพบบิวทานอล 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงด้วย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรพร้อมกับใช้ใบพัดความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบบิวทานอลความเข้มข้นสูงถึง 0.117 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และจำนวนเซลล์สูงสุด $2.30 \pm 0.40 \times 10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักทั้งหมดยังพบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในปริมาณเล็กน้อยอีกด้วย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถนำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เติมกลีเซอรอลแทนกลูโคสมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในการผลิตบิวทานอล

คำสำคัญ : *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 บิวทานอล อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC กลูโคส กลีเซอรอล

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Production of Biobutanol Using *Clostridium acetobutylicum*
Students	Kissaka Intarasuwan
	Natrujee Meenpran
	Budsabong Ponyium
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

ABSTRACT

The cultivation and butanol production of *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 in glucose-yeast extract-casein-cysteine (GYCC) media composed of glucose and glycerol was studied. Growth and butanol production by *C. acetobutylicum* TISTR 1462 was studied in two different conditions at 30°C in 250 mL flasks, in 2-L bioreactor with and without agitation. The maximum amount of cells ($2.24 \pm 0.17 \times 10^{9}$ 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 $2.30 \pm 0.40 \times 10^{8}$ 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. As a consequence of this research, GYCC medium composed of glycerol as a carbon source was suitable for *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 for butanol production.

Keywords : *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462, butanol, Media glucose-yeast extract-casein-cysteine (GYCC), Glucose, Glycerol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาตรบัณฑิตของคณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งโครงงานนี้สามารถประสบความสำเร็จได้เนื่องจากความอนุเคราะห์และการสนับสนุนของ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษนี้ที่ได้เสียสละเวลามาให้ความรู้และคำปรึกษาตลอดการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู ที่เสียสละเวลามาเป็นประธานกรรมการและกรรมการ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.นพพล เล็กสวัสดิ์ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ช่วยวิเคราะห์ HPLC หาปริมาณบิวทานอล ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดต่างๆมาให้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ได้แก่ พี่เอก พี่วิทยา และพี่ประสิทธิ์ที่ให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคน และครอบครัวที่ให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจจนโครงงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นางสาวกฤศกา อินทรสุวรรณ
นางสาวนัฏรุจี หมีนพราน
นางสาวบุษบงษ์ พลเยี่ยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VII
สารบัญรูป		XIII
บทที่ 1	**บทนำ**	1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
2.1	บิวทานอล	4
	2.1.1 ข้อมูลโดยทั่วไป	4
	2.1.2 คุณสมบัติโดยทั่วไป	4
	2.1.3 การใช้งานโดยทั่วไป	5
	2.1.4 คุณสมบัติที่สำคัญทางด้านพลังงาน	5
	2.1.5 คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน	6
	2.1.6 การใช้พลังงานจากบิวทานอลในอนาคต	8
	2.1.7 ข้อเปรียบเทียบในการใช้บิวทานอลกับเอทานอล	8
	2.1.8 การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล	9
2.2	กลีเซอรอล	12
	2.2.1 ประวัติของกลีเซอรอล	13
	2.2.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล	14
	2.2.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	14
	2.2.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล	15
	2.2.5 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
2.3	เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*	24
	2.3.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา	24
	2.3.2 อนุกรมวิธาน	24
	2.3.3 โรคที่เกิดจากเชื้อ *Clostridium* sp.	25
	2.3.4 คุณสมบัติทางชีวเคมี	26
2.4	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3	**วิธีการดำเนินงานวิจัย**	31
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	31
3.2	อุปกรณ์	31
3.3	อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
3.4	การเตรียมหัวเชื้อ	32
3.5	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและ Pre-Culture	32
	3.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	32
	3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักในถังหมัก	32
3.6	กระบวนการหมัก	33
	3.6.1 กรบวนการหมักในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง	33
	3.6.2 กระบวนการหมักในถังหมักสภาวะไม่ใช้ใบพัด	33
	3.6.3 กระบวนการหมักในถังหมักสภาวะที่ใช้ใบพัด	33
3.7	วิธีการหาจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ที่มีชีวิตอยู่	34
3.8	วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์	34
	3.8.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ	34
	3.8.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอื่นๆ	34
	3.8.3 วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ	35
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผล**	36
4.1	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์	36
4.2	การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารอินทรีย์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* แบบไม่ใช้ใบพัด	40
4.2.2 การเจริญเติบโตและการผลิตสารอินทรีย์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* แบบใช้ใบพัด	46
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	54
5.1 สรุปผลการทดลอง	54
5.2 ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน	59
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ	66
ภาคผนวก ค ข้อมูลจากการทดลอง	112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล	5
2.2	การเปรียบเทียบการใช้บิวทานอลเทียบกับเอทานอล	7
2.3	คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	14
2.4	มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้	15
2.5	รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล	17
4.1	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	38
4.2	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	39
4.3	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	41
4.4	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44
4.5	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	46
4.6	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
4.8	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	51
4.9	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
ก.1	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์	59
ก.2	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร	60
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	66
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	68
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	70
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.5	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	74
ข.6	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	76
ข.7	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรที่สภาวะนิ่ง	78
ข.8	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	80
ข.9	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	82
ข.10	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	84
ข.11	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	86
ข.12	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	88
ข.13	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	90
ข.14	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	92
ข.15	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	94
ข.16	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.17	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	98
ข.18	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	100
ข.19	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	102
ข.20	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	104
ข.21	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	106
ข.22	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	108
ข.23	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	110
ค.1	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	112
ค.2	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	113
ค.3	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบวางนิ่งในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	114
ค.4	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบวางนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค.5	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	117
ค.6	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน	118
ค.7	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่งในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	120
ค.8	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบวางนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	121
ค.9	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบกวน ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	122
ค.10	ปริมาณกลีเซอรอลและกรดแลคติกที่พบในการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่งในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	123
ค.11	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	124
ค.12	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	125
ค.13	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	127
ค.14	ปริมาณสาร(กรัมต่อลิตร)ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่สภาวะกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	128

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	2
2.1	โครงสร้างของบิวทานอล	4
2.2	ค่า Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน	7
2.3	วิถีการสังเคราะห์อะซิโตน-บิวทานอลของเชื้อ *Clostridium*	11
2.4	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	12
2.5	กระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง เรียกว่า Saponification	13
2.6	สมการแสดงปฏิกิริยาแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด	13
2.7	ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช	15
2.8	ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล	23
2.9	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	24
2.10	วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับ จำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC	30
4.1	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	37
4.2	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่สภาวะนิ่ง	38
4.3	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออลและไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย สร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลเท่านั้น ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม	43
4.5	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	44
4.6	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	45
4.7	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์*Clostridium acetobutylicum* และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด	47
4.8	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	49
4.9	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	50
4.10	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	52
ก.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส	60
ก.2	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส	61
ก.3	กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	61
ก.4	กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	62
ก.5	กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ก.6	กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาโอนิคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	63
ก.7	กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	63
ก.8	กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	64
ก.9	กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	64
ก.10	กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

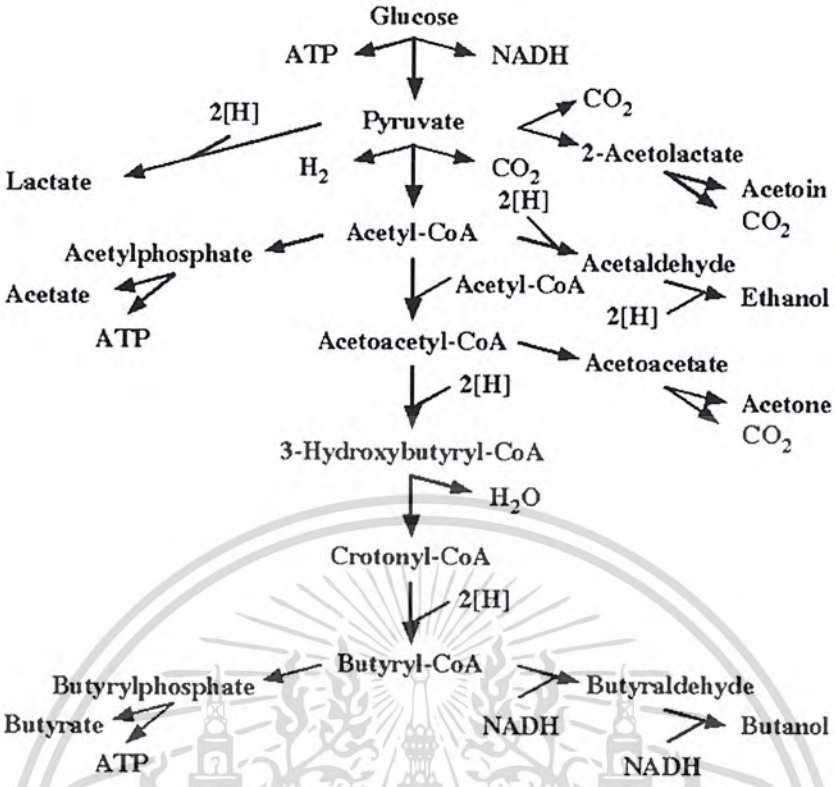
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

บิวทานอลมีชื่อเรียกอยู่หลายชื่อ เช่น บิวทิลแอลกอฮอล์ (butyl alcohol) หรืออีกชื่อหนึ่งจะเรียกว่า ไบโอบิวทานอล (biobutanol) ในกรณีที่ผลิตมาจากกระบวนการทางชีวภาพ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยสายคาร์บอน 4 ตัว และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลคือ C_4H_9OH คุณสมบัติของบิวทานอลโดยทั่วไป คือ มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ -89 องศสาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะที่มากกว่าเอทานอลและเมทานอล ในสภาวะปกติจะอยู่ในสถานะของเหลว ระเหยได้ง่าย และสามารถติดไฟได้ง่ายจึงเหมาะสมในการใช้เป็นเชื้อเพลิง (Wikipedia®, 2010)

ในปัจจุบันบิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวาง ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์และใช้เป็นตัวทำละลายที่ต้องการ ระเหยช้าเนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือดจุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอมและในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้นเพราะสามารถใช้ในเครื่องยนต์ได้โดยตรง โดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ดัดแปลงเครื่องยนต์ ซึ่งบิวทานอลมีค่าความร้อนมากกว่าเอทานอลและมีค่าความร้อนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน เราจึงสามารถที่จะใช้บิวทานอลเป็นพลังงานแทนน้ำมันได้ดีกว่าเอทานอล บิวทานอลสามารถผสมกับไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดเขม่าที่ปล่อยออกมาได้ (Wikipedia®, 2010)

กระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตบิวทานอลนั้นเกิดจากการนำเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการหมัก โดยในการทำงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เพื่อผลิตบิวทานอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก ซึ่งเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิวริก (butyric acid) บิวทานอล (butanol) อะซิโตอิน (acetoin) เอทานอล อะซีโตน (acetone) และกระบวนการเมทาบอลิซึมที่เกิดขึ้นดังภาพที่ 1.1 (Durre, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.1 กระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
ที่มา: Durre (2008)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ

2. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC โดยหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และทำการศึกษาในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่งกับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะตั้งนิ่ง และมีการใช้ใบพัดที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อผลิตบิวทานอลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกแทนการใช้น้ำมันดิบ
2. เพื่อเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

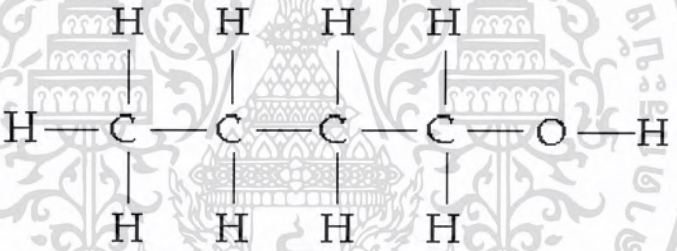
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

บิวทานอล มีชื่อเรียกอยู่หลายชื่อ เช่น บิวทิลแอลกอฮอล์ (butyl alcohol) หรืออีกชื่อหนึ่งจะเรียกว่า ไบโอบิวทานอล (biobutanol) ในกรณีที่ผลิตมาจากกระบวนการทางชีวภาพบิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยสายคาร์บอน 4 ตัวและหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลดังนี้ C_4H_9OH และมีสูตรโครงสร้างตามรูปที่ 2.1

(http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf, 2553)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบิวทานอล

ที่มา : http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (22 กันยายน 2553)

2.1.2 คุณสมบัติทั่วไป

บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เป็นมีสารมีขั้วอ่อนๆ ซึ่งมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่ต่ำ ในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลว และระเหยได้ง่าย บิวทานอลสามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้

(http://www.weekendhobby.com/offroad/newenergy/Question.asp?ID=1684, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การใช้งานโดยทั่วไป

ในปัจจุบันบิวทานอลได้ถูกนำมาใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ เป็นตัวทำละลายที่ต้องการการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล นอกจากนี้ บิวทานอลยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอม และในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้ในเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลมีค่าความร้อนมากกว่าเอทานอล และมีค่าความร้อนใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีน ดังแสดงคุณสมบัติทางพลังงานในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล

ชนิดน้ำมัน	พลังงานที่ให้ (MJ/L)	อัตราส่วนอาหารต่อเชื้อเพลิง	พลังงานจำเพาะ (MJ/kg air)	ความร้อนของการระเหย (MJ/Kg)
น้ำมันแก๊สโซลีน	32	14.6	2.9	0.36
บิวทานอล	29.2	11.2	3.2	0.43
เอทานอล	19.6	9.0	3.0	0.92
เมทานอล	16	6.5	3.1	1.2

ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (2553)

2.1.4 คุณสมบัติที่สำคัญทางด้านพลังงาน

การเปลี่ยนรูปพลังงานที่ได้จากบิวทานอลจะเหมือนกับแอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ กล่าวคือ

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน (Gasohol)
3. นำไปผสมกับน้ำมันดีเซล (Desohol)
4. ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูง
5. ค่าออกเทน จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ใช้ผลิตกระแสไฟฟ้าจาก Fuel cell แต่อยู่ในขั้นการวิจัย แต่มีแนวโน้มได้ได้ผลดีกว่าการใช้แอลกอฮอล์ตัวอื่นๆ

(http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf, 2553)

2.1.5 คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

ก) คุณสมบัติในการรวมตัวของบิวทานอลกับน้ำมัน

บิวทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้เป็นอย่างดีในทุกส่วนผสม และไม่ปรากฏการแยกตัวถึงแม้ตั้งทิ้งไว้นาน

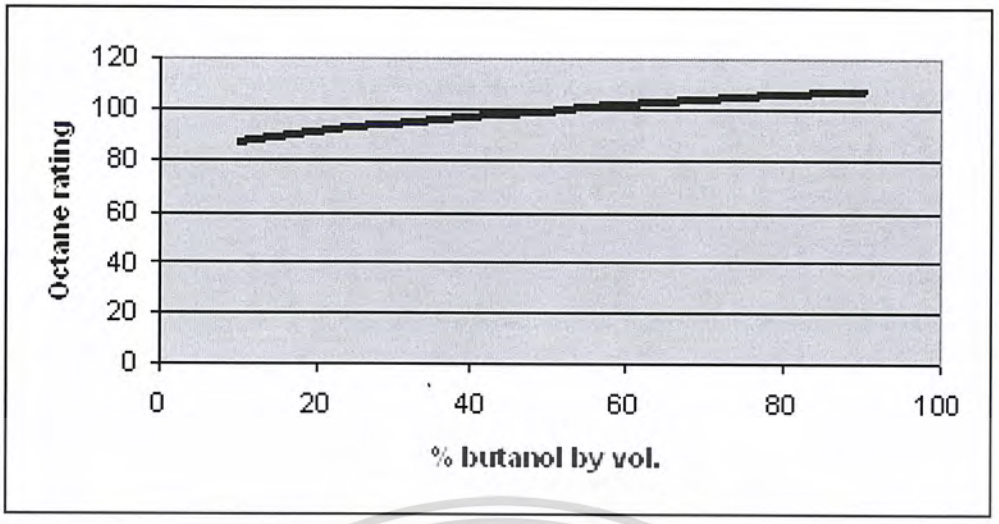
ข) ค่าออกเทน (Octane rating)

ค่าออกเทน (Octane rating) ของบิวทานอลมีค่าประมาณ 100 เมื่อผสมน้ำมันกับบิวทานอล ค่าออกเทนของน้ำมันเบนซินเพิ่มขึ้นในอัตราที่น่าสนใจ กล่าวคือ ค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่าต่อการเติมบิวทานอลทุก 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของบิวทานอลที่ผสม ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 2.2 ทั้งนี้อัตราเพิ่มของค่าออกเทนจะลดลงเล็กน้อย เมื่อส่วนผสมเพิ่มมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทน (Octane improver) แทนที่สารตะกั่วหรือสาร MTBE (Methyl-Tertiary Butyl Ether) เป็นสารเคมีที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ผลิตขึ้นได้จากปฏิกิริยาทางเคมีระหว่าง Methanol และ Isobutane ได้ซึ่งในอัตราส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้น้ำมันเบนซินธรรมดาในท้องตลาดประเทศไทยมีค่าออกเทนประมาณ 91 ซึ่งเพียงพอกับเครื่องยนต์ส่วนใหญ่ที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย

ค) ค่าซีเทน (Cetane rating)

ส่วนค่าซีเทน (cetane rating) ซึ่งใช้เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันดีเซล พบว่าบิวทานอลมีค่าซีเทนประมาณ 28 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าซีเทนของน้ำมันดีเซล ซึ่งมีค่าประมาณ 48.8 จะเห็นว่าค่าซีเทนของบิวทานอลต่ำกว่ามาก จนมีความจำเป็นต้องเติมสารเพิ่มค่าซีเทน (Cetane improver) เช่น ไอโซบิว-ทิวไนเตรต (Isobutyl nitrate) พบว่าหากผสมน้ำมันดีเซล 75 เปอร์เซ็นต์ บิวทานอล 23.75 เปอร์เซ็นต์ และไอโซบิวทิวไนเตรต 1.25 เปอร์เซ็นต์ จะได้ค่าซีเทน 45.4 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า ซีเทนของน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว (High speed diesel fuel) ซึ่งมีค่าซีเทน 48.8 ส่วนคุณสมบัติอื่นๆสามารถดูได้ในตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ค่า Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน
ที่มา: http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (22 กันยายน 2553)

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบการใช้บิวทานอลเทียบกับเอทานอล

ประเด็น	บิวทานอล	เอทานอล
1. ค่า Octane	- ไม่สูงกว่าน้ำมันมากนักทำให้ผสมกับน้ำมันได้มากกว่า	- ค่าออกเทนสูงมากทำให้เกิดความร้อนสูง
2. ค่า Certain	- ต่ำ แต่ถ้าผสมสาร Certain improver ก็ทำให้ใช้ได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์	- ต่ำมาก และต้องผสมสาร Certain improver และต้องดัดแปลงครื่องยนต์
3. การรวมตัวกับน้ำมัน	- รวมตัวได้ดีไม่เกิดการแยกชั้น	- ถ้ามีน้ำเข้าในระบบจะเกิดการแยกชั้นได้ง่ายและจะทำให้ค่า Octane ของน้ำมันต่ำลง ทำให้เครื่องนอกซ์

ที่มา : http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (24 กันยายน 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) เปรียบเทียบการใช้บิวทานอลเทียบกับเอทานอล

ประเด็น	บิวทานอล	เอทานอล
4. การกัดกร่อน	- ไม่มีการกัดกร่อน ทำให้สามารถขนส่งตามท่อได้และไม่มีปัญหากับเครื่องยนต์	- กัดก่อนสูง ทำให้ไม่สามารถส่งทางท่อได้และยังให้เครื่องทำให้เครื่องยนต์สึกหรอ - ผลิตได้มากและมีราคาถูก
5. ปริมาณการผลิต	- ผลิตได้น้อยและมีราคาแพง	- ผลิตได้ง่ายและมีผลผลิตมาก
6. เทคโนโลยีการผลิต	- ยังอยู่ในช่วงการวิจัยให้มีผลผลิตสูงๆ	อยู่แล้ว
7. ราคาต้นทุน	- สูง(แต่ปัจจุบันเริ่มสูสีกัน) 29.2 MJ/L	- ต่ำ 19.6 MJ/L
8. การ Start เครื่อง ณ อุณหภูมิต่ำ	- ยากเนื่องจากค่า Heat of vaporization สูง	- ง่าย เนื่องจากค่า Heat of vaporization ต่ำ

ที่มา : http://www.thaienergydata.in.th/econtent/upload_pic/1190688836.pdf (24 กันยายน 2553)

2.1.6 การใช้พลังงานจากบิวทานอลในอนาคต

บิวทานอลจัดว่าเป็นแอลกอฮอล์ที่มีอนาคตไกลมากที่สุดเนื่องด้วยเหตุผลหลายประการ คือ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่บริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันแก๊สโซลีนและไม่ต้องเก็บในระบบที่มีความดันสูงเหมือนแก๊สธรรมชาติเนื่องจากการระเหยต่ำ ซึ่งต่ำกว่าการระเหยของน้ำมัน สามารถรวมตัวกับน้ำมันได้ดีไม่เกิดการแยกตัว สามารถขนส่งตามท่อเนื่องจากไม่มีการกัดกร่อนเหมือนแอลกอฮอล์ตัวอื่น

2.1.7 ข้อเปรียบเทียบการใช้บิวทานอลเทียบกับเอทานอล

เป็นไปตามตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.8 การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล

อะซิโตนและบิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆกันอย่างกว้างขวาง เช่น ใช้ในการผลิตแลคเกอร์ เรซิน ยาง ไขมัน น้ำมันดีเทอร์เจนต์ และ น้ำมันเบรก ฯลฯ กระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล เป็นตัวอย่างของกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic fermentation) ที่พัฒนาขึ้นตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 เนื่องจากความต้องการอะซิโตนเพื่อใช้เป็นตัวทำละลายคอร์ไดท์ (Cordite) สำหรับใช้ในการผลิตวัตถุระเบิด TNT (Trinitrotoluene) ทำให้มีการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมและพัฒนากระบวนการหมักเพื่อผลิตอะซิโตนเกิดขึ้นในประเทศอังกฤษ อย่างไรก็ตามหลังจากสงครามโลกครั้งที่ 1 ผลผลิตที่สำคัญจากกระบวนการหมักนี้ได้เปลี่ยนไปเป็นบิวทานอลเพื่อนำไปใช้เป็นตัวทำละลายไนโตรเซลลูโลสแลกเกอร์ (Nitrocellulose lacquers) สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตรถยนต์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1930 เริ่มมีการผลิตอะซิโตนและบิวทานอลได้โดยวิธีการทางเคมีจากสารที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันปิโตรเลียม ซึ่งมีต้นทุนต่ำกว่าการผลิตโดยวิธีการหมัก ดังนั้นการผลิตอะซิโตนและบิวทานอลโดยวิธีการทางเคมีจึงเริ่มเข้ามาแทนที่การผลิตโดยวิธีการหมัก จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1960 อุตสาหกรรมการหมักอะซิโตน-บิวทานอลส่วนใหญ่จึงได้ปิดตัวลงยกเว้นในบางประเทศในแอฟริกาใต้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันราคาผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียมเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในอนาคตกระบวนการหมักอาจกลับมามีบทบาทสำคัญในการผลิตอะซิโตน-บิวทานอลอีกก็ได้ (http://thaimisc.pukpik.com/freewebboard/php/vreply.php?user=alls&topic=668&page=1, 20 กันยายน 2553)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักอะซิโตน-บิวทานอล

จุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการผลิต อะซิโตน-บิวทานอล ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum C. beijerinckii* และ *C. saccharobutylicum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีอากาศ (Anaerobe) หรือเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจแต่ออกซิเจนก็ไม่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ตาย (Aerotolerent) สร้างเอนโดสปอร์ได้ ทำให้ทนความร้อนสูง และเมื่ออยู่ในรูปสปอร์จะสามารถทนออกซิเจนได้ดี แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน (Rod) บางสปีชีร์เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสิ่งมีชีวิต (Pathogenic) โดยการผลิตสารพิษ (Toxin) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แบคทีเรียมีการสร้างสปอร์ การเจริญของสปอร์ *Clostridium* สามารถถูกยับยั้งได้โดยแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น แบคทีเรียแลคติก ส่วนกลุ่มที่เป็น Non-pathogenic Bacteria สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ บางสปีชีร์มีความสามารถในการหมักเพื่อให้เกิดตัวทำละลายในกระบวนการอุตสาหกรรมได้หลายชนิด เช่น อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ซึ่งมนุษย์มีการนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลาช้านาน

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอะซิโตน-บิวทานอลนั้น โดยทั่วไปนิยมเก็บรักษาในรูปสปอร์ในดิน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก และสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นาน

วิถีการสังเคราะห์อะซิโตน-บิวทานอล

การหมักน้ำตาลกลูโคสโดย *Clostridium* นอกจากจะได้อะซิโตนและบิวทานอลแล้ว ยังทำให้เกิดผลผลิตอื่นๆ อีกหลายชนิด คือ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก ไอโซโพรพานอล ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอัตราส่วนของผลผลิตแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (สมใจ 2547)

กระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล

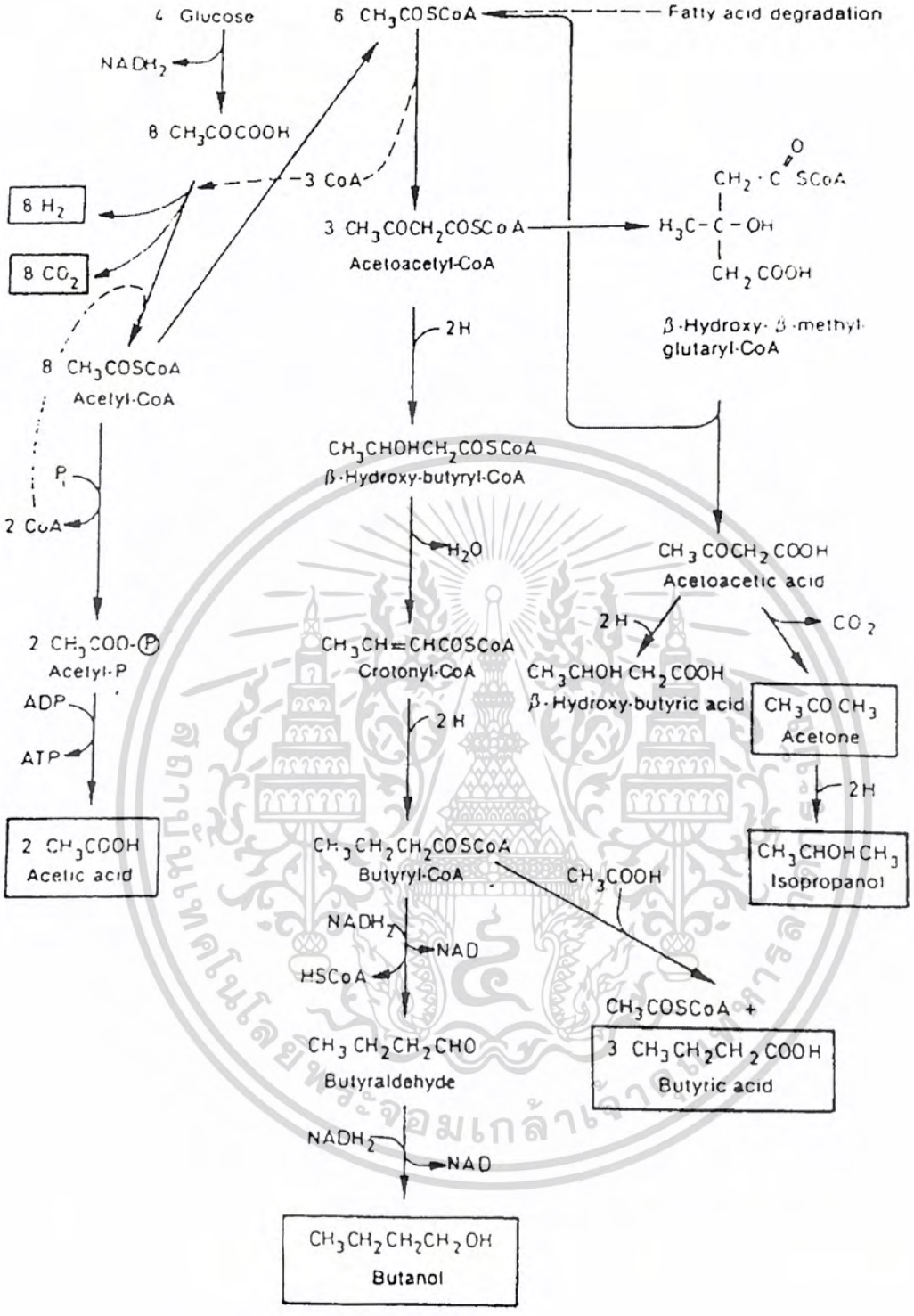
กระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล เป็นกระบวนการหมักแบบที่ไม่ต้องการออกซิเจน จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการให้ออกซิเจนในกระบวนการหมัก และยังประหยัดพลังงานที่ต้องใช้ในกระบวนการผสมอีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบที่ต้องการออกซิเจน

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้ในกระบวนการหมัก โดยทั่วไปจะนำ Stock culture มาทำ Heat shock ก่อนโดยใส่สปอร์ลงในอาหาร Semisolid potato-glucose medium หรือ Corn medium ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดสอบในลักษณะ Deep tube ทำให้สปอร์ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด นำไปต้มในน้ำเดือด 90 วินาที แล้วนำออกมาทำให้เย็นทันที การทำเช่นนี้จะทำให้เซลล์ธรรมดาและสปอร์ที่ไม่ทนความร้อนถูกทำลาย เหลือแต่สปอร์ที่ทนความร้อน ซึ่งสามารถผลิตอะซิโตน-บิวทานอลได้สูง หลังจากนั้นจึงบ่มเชื้อไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปเพิ่มจำนวนต่อในปริมาตรมากขึ้น จนได้เชื้อเริ่มต้นปริมาณมากตามต้องการ

การเก็บเกี่ยวอะซิโตนและบิวทานอลออกจากของเหลวที่ได้จากกระบวนการหมักทำได้โดยการกลั่น หลังจากนั้นก็แยกอะซิโตนออกจากบิวทานอลได้โดยการกลั่นลำดับส่วน

ปัญหาที่มักพบในกระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล ได้แก่ การปนเปื้อนแบคทีริโอเฟจและแลคโตแบซิลไล (Lactobacilli) การป้องกันสามารถทำได้โดยการสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก รวมทั้งแก๊สและสารที่จะเติมเข้าไปในถังหมัก ใช้เชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์และรักษาสภาพปลอดเชื้อในระหว่างการหมักให้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



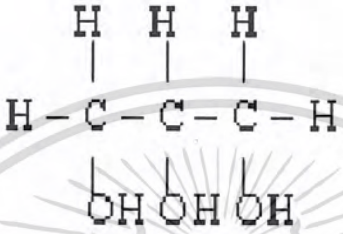
รูปที่ 2.3 วิถีการสังเคราะห์อะซิโตน-บิวทานอลของเชื้อ *Clostridium*

ที่มา: สมใจ (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กลีเซอรอล

เป็นสารประกอบอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง สูตรเคมีคือ $C_3H_8O_3$ เป็นของเหลวข้น ไม่มีสี มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 290 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ เป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันหรือน้ำมัน เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอริน ใช้ในอุตสาหกรรมทำยา เครื่องสำอาง สบู่ เป็นต้น มีโครงสร้างตามรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา : http://www.lks.ac.th/student/kroo_su/chem8/pic/Untitled-35.jpg (24 กันยายน 2553)

คุณสมบัติของเอซิลกลีเซอรอล

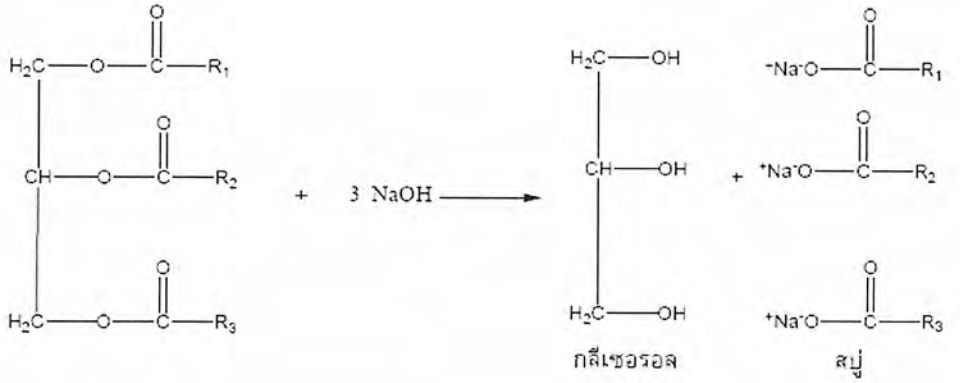
(1) ไตรเอซิลกลีเซอรอลในพืชมีจุดหลอมเหลวต่ำเพราะส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว จึงเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ส่วนในสัตว์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว จึงมีจุดหลอมเหลวสูงและเป็นของแข็งหรือครึ่งแข็งครึ่งเหลวที่อุณหภูมิห้อง

(2) ไตรเอซิลกลีเซอรอลทุกชนิดไม่ละลายน้ำและไม่สร้างไมเซลล์ ส่วนพวกมอโนและไดเอซิลกลีเซอรอล มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อิสระจึงมีความเป็นโพลาร์มากกว่าและสร้างไมเซลล์ได้ พวกเอซิลกลีเซอรอลสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

(3) เอซิลกลีเซอรอลสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยการต้มกับกรด เบส หรือใช้เอนไซม์ไลเปส (Lipase) ซึ่งมีอยู่ในน้ำย่อยจากตับอ่อน กระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยด่างจะได้กลีเซอรอล และสบู่ของกรดไขมันเรียกว่าซาพอนิฟิเคชัน (saponification) ดังรูปที่ 2.5

(http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-25.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

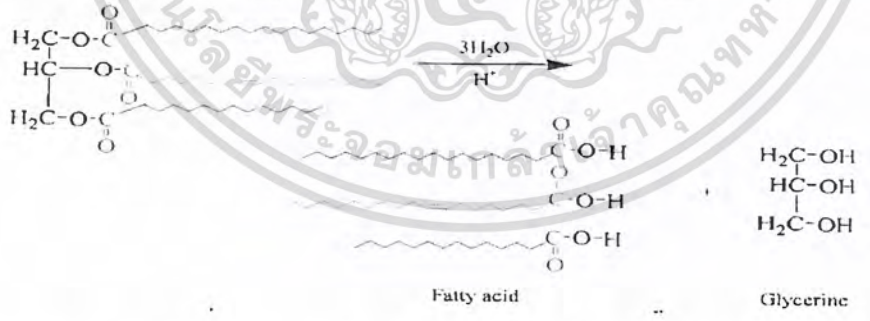


รูปที่ 2.5 กระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยด่าง เรียกว่า Saponification

ที่มา : http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-25.html (24 กันยายน 2553)

2.2.1 ประวัติของกลีเซอรอล

สารกลีเซอรอลถูกค้นพบครั้งแรกในปีค.ศ. 1779 โดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (Sponification) ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่ากลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบ ทุกชนิดโดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอรอลที่มีหมู่เอสเทอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่เรียกว่าไตร-กลีเซอไรด์ (Triglyceride) เมื่อนำไขมันหรือน้ำมันมาแยกสลายด้วยน้ำในสภาวะกรดจะได้กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (Fatty acid) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 สมการแสดงปฏิกิริยาแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด

ที่มา : อมรและคณะ (2550)

ในช่วงแรกได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตกาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้กาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี ค.ศ.1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (Dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โตรกลีเซอรีน (Nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (Silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม (อมรและคณะ, 2550)

2.2.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3-propanetriol เป็นแอลกอฮอล์อย่างง่าย (Simple alcohol) ชนิดหนึ่งซึ่งมีการใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี เครื่องจักร เครื่องยนต์ อาหาร ยาสูบ เภสัช-กรรม เยื่อกระดาษ เครื่องหนัง และสิ่งทอ แสดงดังตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้น (Feedstock) สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanedial) ได้อีกด้วย (Biebl และคณะ, 1998, 1999)

2.2.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล แสดงในตารางที่ 2.4

2.2.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

2.2.4.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล หรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

ในขบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชหรือไขสัตว์ โดยการสกัดกลีเซอรอลออกด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล เรียกขบวนการนี้ว่า Transesterification โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) เป็น กรด เบส หรือ เอนไซม์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพและส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ เพื่อให้ได้โมโนแอลคิลเอสเตอร์ (Monoalkyl ester) หรือเมทิวเอสเตอร์ (Methyl ester) ตามสมการในรูปที่ 2.7 เมื่อน้ำมันพืชถูกเปลี่ยนเป็นเมทิวเอสเตอร์แล้วขนาดโมเลกุลจะลดลงเหลือ 1 ใน 3 เป็นผลทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลงอย่างมากใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล

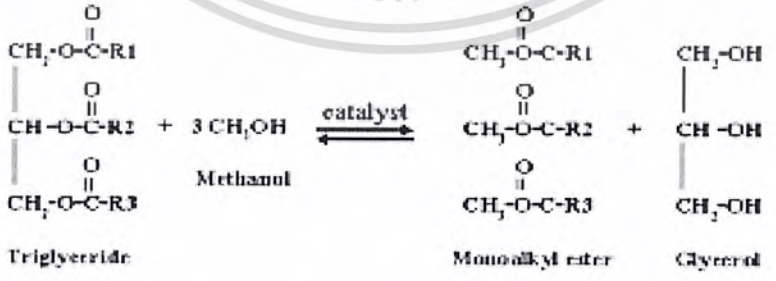
กลีเซอรอลหรือกลีเซอรีน (Glycerin) สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติเมื่อซึมผ่านลงไปในดิน ซึ่งจะถูกแบคทีเรียย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว ไม่เป็นสารพิษ (Non-toxic) ไม่เป็นอันตรายต่อพืชและสัตว์ เมทานอลหรือเอทานอลที่เป็นส่วนเกินจากปฏิกิริยา สามารถระเหยไปในอากาศเองได้ เมื่อทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์เราสามารถนำกลีเซอรีนส่วนนี้ไปทำสบู่เพื่อใช้ทำความสะอาดต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 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
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	5 ที่ 20 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	17.8 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
ความดันไอ	0.0025 มิลลิปรอท ที่ 50 องศาเซลเซียส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mallinckrodt Chemicals และ The Columbia Electronic Encyclopedia, 6th ed. Copyright © 2007, Columbia University Press



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช

ที่มา: http://www.barascientific.com/article/Biodiesel/biodiesel.php (25 กันยายน 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ กลีเซอรีนบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายอย่างและมีราคาที่แพงมาก อย่างไรก็ตามกลีเซอรีนที่เราได้จากกระบวนการทำไบโอดีเซลนี้มีสารปนเปื้อนอยู่มาก ส่วนใหญ่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและแอลกอฮอล์ส่วนเกินอีกทั้งคราบอื่นๆที่ปนเปื้อนมาในน้ำมันภายหลังการทำอาหาร การจะระเหยเอาแอลกอฮอล์ออกจากกลีเซอรีนให้หมดนั้นต้องถูกนำมาต้มในที่ที่มีอากาศถ่ายเท ถ้าใช้เมทานอลต้องต้มให้ความร้อนสูงเกินจุดเดือด (Boiling point) คือที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ถ้าใช้เอทานอลจะต้องต้มให้ความร้อนสูงเกิน 79 องศาเซลเซียส และถ้าต้องการระเหยน้ำออกให้หมดต้องต้มอย่างต่ำ 10 นาที กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่หรือแม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ การปรับสภาพคุณสมบัติให้เป็นกรดเพื่อแยกชั้นของกลีเซอรอลกับไขมัน โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อแยกตะกอนของเกลือออกจากการทดลอง เมื่อทำให้กลีเซอรอลมีความเป็นกรดอยู่ที่ 2–4 จะทำให้มีชั้นของกลีเซอรอลแยกออกมา 38–40 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบตามมาตรฐาน BS 5711 จะพบว่ากลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์อยู่ที่ 80–85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสบู่และสามารถเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอลได้ และมาตรฐานของกลีเซอรอลที่แบ่งตามอุตสาหกรรมมีตามตารางที่ 2.5

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล จำเป็นต้องแยกกลีเซอรอลออกจากไบโอดีเซลให้หมด มิฉะนั้นกลีเซอรอลจะไปอุดหัวฉีดและยังก่อให้เกิดปริมาณอัลดีไฮด์ในท่อไอเสียเครื่องยนต์ ขณะเผาไหม้สูงกว่าปกติอีกด้วย โดยปกติการผลิตไบโอดีเซลแต่ละครั้งจะได้กลีเซอรอลประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นโดยปริมาตร ซึ่งจะทำการแยกออกได้ด้วยการทำให้แยกชั้นออกจากไบโอดีเซลด้วยความแตกต่างของความหนาแน่น ไบโอดีเซลมีความหนาแน่น 0.86 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในขณะที่กลีเซอรอลมีความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีผลทำให้กลีเซอรอลแยกตัวอยู่ชั้นล่างและไบโอดีเซลอยู่ชั้นบนในส่วนของชั้นกลีเซอรอลยังคงมีสิ่งเจือปนอื่น ได้แก่ ไบโอดีเซล ไตรกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ เมทานอล หรือแอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยา โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่และน้ำ เป็นต้น เป็นผลทำให้กลีเซอรอลที่แยกได้ยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้

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

หมายเหตุ มาตรฐานที่ใช้ในการอ้างอิงคุณลักษณะของกลีเซอรอล คือ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.337-2538) และ British Standards Institution (BS 2621-5, 1979)

ที่มา : มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์ มอก. 377-2538 (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yong และคณะ (2001) ทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของกลีเซอรอลที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์ม พบว่า มีปริมาณของสารดังนี้ กลีเซอรอล 20.2 เปอร์เซ็น เถ้า 64.3 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 3.0 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล 12.4 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช (pH) 12.8 และเมื่อแยกสิ่งเจือปนโดยใช้กรดซัลฟิวริกแล้ว พบว่ากลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น กล่าวคือ ได้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ 33.9 เปอร์เซ็นต์ กรดไขมันดิบ (Crude fatty acid) 10.5 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ (Salt) 65.2 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าพีเอช (pH) มีผลต่อปริมาณและความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลจากการปรับเปลี่ยนพีเอช (pH) ของสารละลายกลีเซอรอลจากพีเอช (pH) 1-7 พบว่าที่พีเอช (pH) 1-2 ให้กลีเซอรอลบริสุทธิ์สูงสุด กล่าวคือ มีกลีเซอรอล 54 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 7.4 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล 31.1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนำกลีเซอรอลดังกล่าวไปกลั่นแบบสุญญากาศอย่างง่าย (Simple vacuum distillation) ที่ความดัน 4×10^{-1} ถึง 4×10^{-2} มิลลิบาร์ และ พีเอช (pH) ต่ำกว่า 5 (เพื่อป้องกันการเกิดฟองจากสบู่ที่เกิดขึ้น) ได้กลีเซอรอลกลั่นตัวออกมาที่อุณหภูมิ 120-126 องศาเซลเซียส เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ พบกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 96.6 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.03 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 2.4 เปอร์เซ็นต์และสารอินทรีย์อื่นๆที่ไม่ใช่กลีเซอรอล 2.4 เปอร์เซ็นต์และมีพีเอช (pH) เท่ากับ 3.5

2.2.4.2 กระบวนการทางเคมี (Myers และ Myers, 2007)

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

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

$$H_2C{=}CH\text{-}CH_3 + Cl_2 \longrightarrow H_2C{=}CH\text{-}CH_2Cl + HCL \qquad (1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2)

จากนั้นเติมสารละลายโซเดียม หรือแคลเซียมไฮโดรออกไซด์ลงใน 1, 3 ไดคลอโรไฮดรินจะได้ อีพิคลอโรไฮดริน (epichlorohydrin) ดังสมการที่ 3

(3)

ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ (4)

(4)

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

2.2.4.3 กระบวนการทางชีวภาพ

Da Silva และคณะ (2009) กล่าวถึงปิโตรเลียมเป็นแหล่งพลังงานที่ถูกใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุดในโลก แต่มีลักษณะที่ต้องใช้อย่างจำกัด จึงทำให้ต้องหาแหล่งพลังงานที่นำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นที่สนใจกันอย่างมาก อย่างเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) เช่น เอทานอล และไบโอดีเซล ซึ่งเต็มไปด้วยแหล่งต่างๆ เพื่อไปแทนที่ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Fossil fuel) ไบโอดีเซลสามารถแทนที่ปิโตรเลียมดีเซล (Petroleum diesel) ผลิตจากไขมันสัตว์และน้ำมันพืช ซึ่งสร้างกลีเซอรอลเป็น ผลพลอยได้ (By product)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งส่วนเกินของกลีเซอรอลที่ถูกสร้างขึ้นอาจจะกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งกลีเซอรอลไม่สามารถถูกจัดการให้หมดไปในสิ่งแวดล้อม จึงเป็นไปได้ที่จะมีการนำกลีเซอรอลไปใช้ โดยอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และ/หรือแหล่งพลังงานจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นสารเคมีโดยใช้กระบวนทางชีวภาพให้มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) ไดไฮดรอกซีอะซีโตน (Dihydroxyacetone) เอทานอล (Ethanol) ซัคซิเนท (Saccinate) เป็นต้น

ตารางที่ 2.6 แสดงให้เห็นถึงรายงานการศึกษาการผลิตกลีเซอรอลจากเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล

สายพันธุ์	สารตั้งต้น	กระบวนการ/ ระดับการผลิต	ความเข้มข้นกลีเซอรอลในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล)	อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	เอกสารอ้างอิง
ยีสต์						
S. cerevisiae	กากน้ำตาล	Batch sulfite/ 12 ลิตร	55	25	11.5	Cocking และ Liliy (1919)
	กลูโคส	Batch insoluble sulfite/ 2.5 ลิตร	35	23	11.6	Underkofler (1954)
	กลูโคส	Continuous sulfite/pilot plant	50	28	33	Freeman และ Donald (1957a)
	กากน้ำตาล	Fed batch sulfite/vacuum, CO_2 sparing	80	25	30	Kalle และคณะ (1985)
	กลูโคส	Batch alkali steered/ 12 ลิตร	45	23	9	Shade และ Farber (1947)

ที่มา: Wang และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล

สายพันธุ์	สารตั้งต้น	กระบวนการ/ระดับการผลิต	ความเข้มข้นกลีเซอรอลในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิต (ร้อยละของการใช้น้ำตาล)	อัตราการผลิตเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	เอกสารอ้างอิง
C. magnoliae	กลูโคส	Aerobic batch process/ shake flask	79	43	20	Spencer และ Shu (1957)
	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 60 ลิตร	170	ND	17	Peterson และคณะ (1958)
P. farinose	กลูโคส	Aerobic fedbatch/ 1ลิตร	300	ND	75	Vijaikishore และ Karanth (1986a)
C. glycerinogens	กลูโคส	Aerobic batch process/ จาก shake flask ถึง 50,000 ลิตร	110-130	52-63	28-32	Zhung และ Fang (1995)
แบคทีเรีย						
B. subtilis	กลูโคส	Batch/shake flask	14.7	29	2	Neish และคณะ (1945)
สาหร่าย						
D. tertiolecta	CO_2	Batch	0.12	ND	0.066	Ben-Amotz และ Avron (1981)

ที่มา: Wang และคณะ (2001)

2.2.5 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล

การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C. pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับการสร้างเป็นผลพลอยได้ (By-product) (Biebl, 2001) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ในวิถี (Biebl และคณะ, 1998) อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการ Redox-balanced เป็นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น Succinic acid แม้ว่าวิถีสำหรับเอทานอลและ Saccinate มีค่าเท่ากับ Redox-balanced ที่เกี่ยวโยงกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิถี Ethanologenic สูงมาก คือ 1 ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละโมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิถี Saccinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง Proton motive force โดย Fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.8

รูปที่ 2.8 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล

ที่มา : Da Silva และคณะ, (2009)

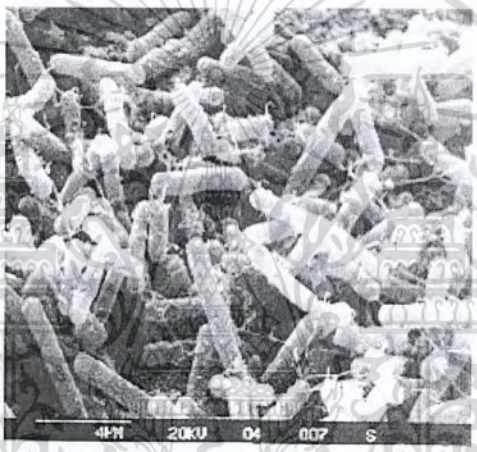
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน ตามพืชผักต่างๆ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ ในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *C. botulinum* เป็นสาเหตุสำคัญของโบทูลิซึม (Botulism) *C. tetani* ทำให้เกิดโรคบาดทะยัก (Tetanus) และ *C. perfringens* ทำให้เกิดก๊าซแกงกรีน (Gas Gangrene)

2.3.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* มีรูปร่างและลักษณะตามรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
ที่มา: http://timnovate.wordpress.com/2009/06/ (2552)

2.3.2 อนุกรมวิธาน

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Clostridia

Order : Clostridiales

Family : Clostridiaceae

Genus : *Clostridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ลักษณะสำคัญของเชื้อ *Clostridium* แต่ละสปีชีส์ คือ ความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างชนิดกันได้ นอกจากนี้เชื้อ *Clostridium* บางชนิดยังสามารถให้ก๊าซมากพอที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้

2.3.3 โรคที่เกิดจากเชื้อ *Clostridium sp.*

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

Clostridium acetobutylicum รูปร่างเป็นแท่ ตรง เคลื่อนที่โดยใช้ Pertrichous flagella สปอร์เป็นรูปไข่อยู่ค่อนไปทางปลายเซลล์ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ สีขาวเทา โปร่งแสงเป็นมัน เจริญได้เล็กน้อยในอาหาร NB แต่ถ้ามีคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อมักจะเจริญได้ดี ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักมีกรดอะซิติก บิวทิวริก บิวทานอล และสร้างอะซีโตน สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจน พบทั่วไปในดิน

Clostridium acetobutylicum อยู่ในจีนัส *Clostridium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเชิงการค้าอย่างมาก บางครั้งสามารถเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า “Wiezmann Organism” ซึ่งเป็นชื่อที่ตั้งตาม Chiam Weizmann ที่ผู้ค้นพบแบคทีเรียชนิดนี้ในปี 1916 เขายังค้นพบอีกว่า *C. acetobutylicum* นั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแป้งโดยใช้กระบวนการ ABE (Acetone Butanol Ethanol process) ในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตดินปืน และดินระเบิด กระบวนการ ABE กลายมาเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมจนกระทั่งปลายปี ค.ศ. 1940 เมื่อน้ำมันมีราคาลดลงทำให้มีผลกระทบอย่างมากต่อกระบวนการพื้นฐานของการแยกไฮโดรคาร์บอน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการกลั่นปิโตรเลียม *C. acetobutylicum* ยังสามารถผลิตกรดอะซีติก กรดบิวทีริก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน

2.3.4 คุณสมบัติทางชีวเคมี

เป็นพวกที่ไม่มีระบบไซโตรโครม และกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนเพื่อสร้างสารพลังงาน ATP ดังนั้นการได้มาซึ่ง ATP จึงต้องผ่านกระบวนการ Substrate-level-phosphorylation การจัดจำพวกในระดับจีนัสออกเป็นสปีชีส์ต่างๆ จะใช้คุณสมบัติในด้านความสามารถในการใช้สารชนิดต่างๆ เป็นแหล่งพลังงาน เช่น *C. cellodioparum* และ *C. thermocellum* สามารถเฟอร์เมนเซลลูโลสแล้วให้ผลเป็นกรดอะซีติก (Acetic acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) เอทานอล (Ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2) ส่วน *C. butyrium*, *C. pasteurianum*, *C. perfringens* และ *C. acetobutylicum* หมักน้ำตาล แป้ง และแพคติน ให้ผลลัพธ์เป็นอะซิโตน (acetone) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (iso-propanol) กรดบิวทิวริก (butyric acid) กรดอะซีติก (acetic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และไฮโดรเจน (H_2)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ (2536) วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต N-butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน จากการศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในกระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium butylicum* NRRL B592 และ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เปรียบเทียบระหว่างวัตถุดิบมันสำปะหลังสด มันสำปะหลังหลังย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งมันสำปะหลัง และผักตบชวาหลังย่อยด้วยกรด ผลจากการทดลองพบว่า การหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดที่ค่าน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ให้บิวทานอลสูงสุด (11.1-11.3 กรัมต่อลิตร) การเพิ่มผลผลิตสามารถทำโดยการพัฒนากระบวนการผลิต และจากการทดสอบความเหมาะสมในการนำบิวทานอลไปผสมกับน้ำมันแก๊สโซลีนเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์สันดาปภายใน เมื่อพิจารณาโดยรวมผลของการใช้ส่วนผสมของแก๊สโซลีนและบิวทานอลที่มีบิวทานอลต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีผลข้างเคียงต่อการทำงานของเครื่องยนต์ไม่มากนักแต่ต้องปรับปรุงสภาพเครื่องยนต์ให้เหมาะสมกว่าเดิมเช่นควรติดตั้ง Ignition time ใหม่ใช้คาร์บูเรเตอร์ที่ให้ค่า A/F Ratio ที่เหมาะสม

คณะเทคโนโลยี โดยวิชัย ลีลาวัชรมาศ, ลักขณา เหล่าไพบูลย์, ประสิทธิ์ ใจศิล (2548) ทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinkii* ด้วยวิธีการหมักแบบกะและกึ่งกะ จากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462 ด้วยการหมักแบบกะภายใต้สภาวะไร้อากาศ การศึกษาในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาสภาวะการกระตุ้นด้วยความร้อน โดยทดลอง 5 สภาวะ ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้น คือ นำสารละลายของสปอร์จุ่มลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที สำหรับการศึกษาการเจริญของ *C. acetobutylicum* TISTR 1462 ในการเลี้ยงแบบกะในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแบบไม่ปั่นเหวี่ยงและปั่นเหวี่ยงจากผลการทดลองพบว่า ที่พีเอช (pH) เริ่มต้น 6.5 มีความเหมาะสมต่อการเจริญมากที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำหมักที่พีเอช(pH) ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์โดยวิธี GC พบว่า มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเพียงอะซิโตนและ เอทานอล แต่ไม่พบบิวทานอล ซึ่งจากผลการทดลองสันนิษฐานว่าสารอาหารในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานไม่เหมาะสมต่อการสร้างบิวทานอล นอกจากนี้พบว่า *C. beijerinckii* JCM 1390 สามารถผลิตบิวทานอลได้ดีที่สุดในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง และเติมอาหารอุดมที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 โดยได้ความเข้มข้นและอัตราผลผลิตบิวทานอลเท่ากับ 4.18 กรัมต่อลิตร และ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาการผลิตบิวทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานดังกล่าวในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า *C. beijerinckii* JCM 1390 สามารถผลิตบิวทานอลได้เพิ่มขึ้น โดยได้ความเข้มข้นและอัตราผลผลิตบิวทานอลเท่ากับ 8.80 กรัมต่อลิตรและ 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

อังคณา มุขพลอย และชรินทร์ เตชะพันธุ์ (2546) ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากฟางข้าว พบว่าองค์ประกอบของฟางข้าว ประกอบด้วย เซลลูโลส 39 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 27 เปอร์เซ็น ลิกนิน 12 เปอร์เซ็นต์ และ เถ้า 11 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้ กรดซัลฟูริก โซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าการใช้สารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ สามารถกำจัดลิกนินได้มากที่สุด และเปลี่ยนฟางข้าวเป็น ไซแลนและกลูแคนได้สูงกว่าการใช้กรดซัลฟูริกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลังจากนั้นนำมาไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง (121 องศาเซลเซียส,15 ปอนด์) พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณฟางข้าวต่อปริมาณกรดซัลฟูริกคือ 1 กิโลกรัมต่อ 1.67 ลิตร ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด 105 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่มีผลกระทบหลักต่อการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 พบว่าเมื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่ดีที่สุด ประกอบด้วย กลูโคสที่มีอยู่ในน้ำคั้นฟางข้าว 70.27 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.56 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ อุณหภูมิในการหมักพีเอช (pH) เริ่มต้นและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะในสภาวะไร้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศที่ ทำให้เชื้อ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด (2.64 กรัมต่อลิตร) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช (pH) เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

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

Gheshlaghi และคณะ(2009) เป็นบทความที่กล่าวถึงเมทาบอลิซึมของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย (heterofermentative) สร้างสปอร์ได้ (Girbal และ Soucaille, 1994) การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol, ABE) แบบแบต (Batch) จะสามารถแบ่งได้ตามเมทาบอริซึมของ *C. acetobutylicum* ออกเป็นสองส่วนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ ขั้นของการให้ผลผลิตที่เป็นกรด และขั้นของผลผลิตที่เป็นสารละลาย (Johnson และคณะ, 1931) ขณะที่อยู่ในขั้นแรกนั้น เซลล์จะเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอะซิเตตและบิวทาเลต กรดเหล่านี้ที่ขับออกมาจะทำให้ค่าพีเอช (pH) ภายนอกลดลง กรดเหล่านี้ถูกนำมาใช้เป็นตัวชักนำในกระบวนการ ชีวสังเคราะห์ของสารละลายอินทรีย์จากเอนไซม์

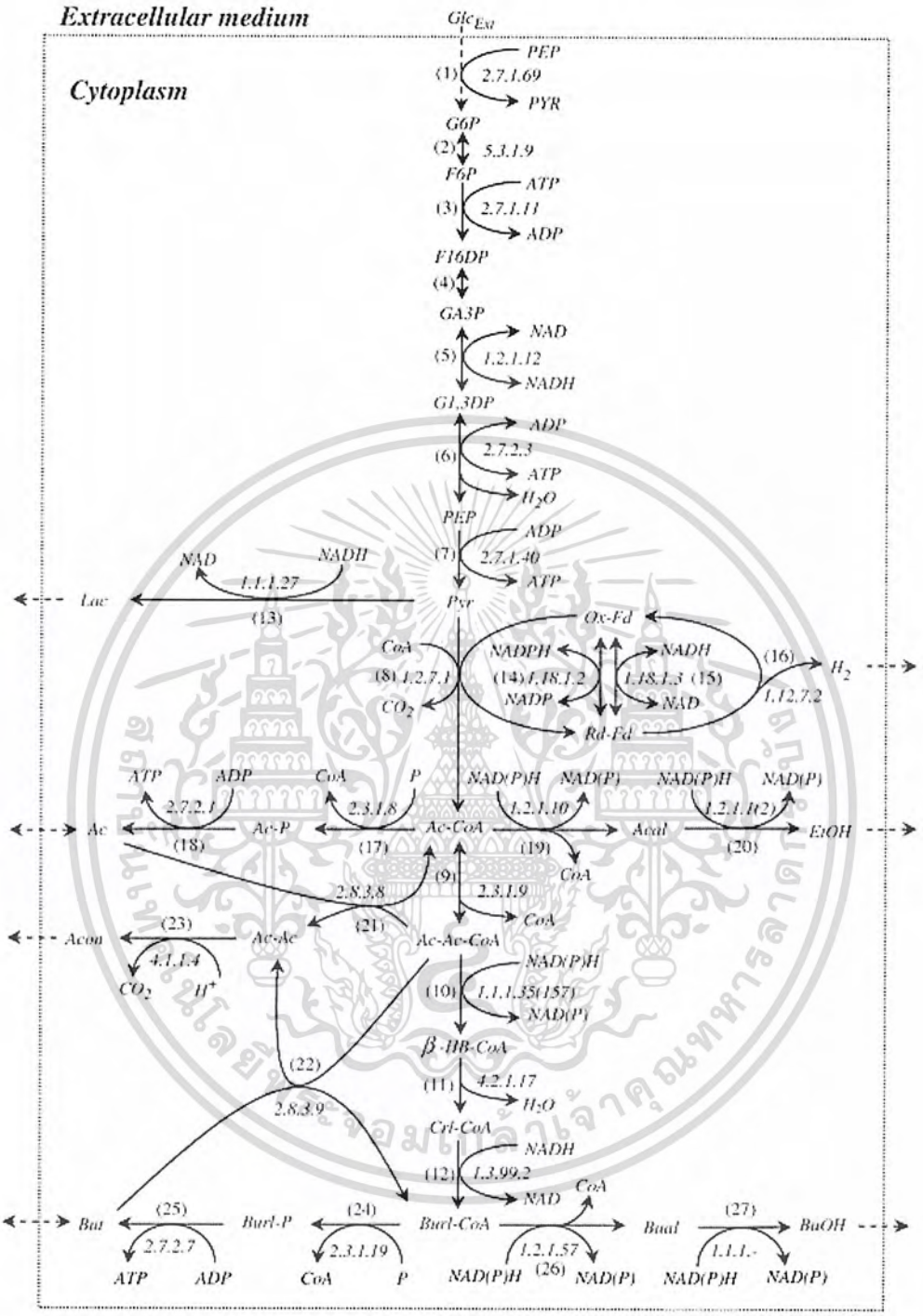
ในกระบวนการหมักขั้นที่สอง (BalLongue และคณะ, 1985) กรดที่เกิดขึ้นมาก่อนหน้านี้จะกลับเข้าไปยังเซลล์ และทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นร่วม (Co-substrates) สำหรับการผลิตสารละลายที่เป็นกลาง (Fond และคณะ, 1985; Kell และคณะ, 1973) เมื่อมาถึงในขั้นตอนนี้ กระบวนการผลิตกรดจะสิ้นสุดลงพร้อมๆ กับการเจริญเติบโตของเซลล์ก็จะสิ้นสุดลงเช่นกัน และค่าพีเอช(pH) ของอาหารจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดถูกดูดกลืนเข้าไปในเซลล์ (Terracciano และ Kashket, 1986; Spivey, 1978) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนไปของกระบวนการผลิตสารละลายนั้น คือการที่เซลล์ปรับตัวเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอบสนองต่ออาหารที่มีค่าพีเอช (pH) ต่ำ อันเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตกรด ผลิตภัณฑ์หลักสุดท้ายที่ได้จากการหมักนี้คือบิวทานอล โดยมีอะซีโตน และเอทานอล เป็นผลิตภัณฑ์รองลงมา แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของคาร์โบไฮเดรต และสภาวะการเพาะเลี้ยง ขอบเขตของการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวทำละลายนี้มีความไม่แน่นอน นอกจากนี้ คาร์บอนและอิเล็กตรอนเป็นตัวกำหนดรูปแบบของตัวทำละลายเหล่านี้ ในท้ายที่สุดของกระบวนการหมักตัวทำละลายอาจจะมีระดับความเข้มข้นจนถึงระดับของการยับยั้ง และทำให้กระบวนการผลิตสิ้นสุดลง (Bowles และ Ellefson, 1985) ตัวทำละลายที่สะสมน่าจะมีผลต่อเซลล์ของ *Cl.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 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับ จำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gheshlaghi และคณะ (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์และเก็บในอาหาร Reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

3.2 อุปกรณ์

ฟลาสก์	บีกเกอร์
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	ขวดใส่อาหาร
หลอดทดลองฝาเกลียว	ถ้วยบ่มไร้อากาศ (Anaerobic jar)
แท่งแก้วคน	กระบอกตวง
ตะเกียงแอลกอฮอล์	เข็มเขี่ยเชื้อ
หลอดหยด	ปิเปต
จุกยางดูดสาร	จุกสำลี
จุกยางปิดฟลาก์ส	หลอดปั่นเหวี่ยง
ขวดเก็บตัวอย่าง	ตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar)	เครื่องปั่นเหวี่ยง(Centrifuge)
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	หม้อนึ่งอัดไอ(Autoclave)
ตู้เย็น	แก๊สไนโตรเจน
เครื่องชั่ง	เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เติมแหล่งคาร์บอนโดยเลือกใช้กลูโคส (Glucose) 10.0 กรัมต่อลิตรหรือกลีเซอรอล (Glycerol) 10.0 กรัมต่อลิตร

3.4 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutyricum*

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นโดยนำหัวเชื้อผงมาเติมลงในอาหาร Reinforced clostridial ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บเป็นสต๊อก (Stock) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและ Pre-culture

3.5.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutyricum*

มีส่วนประกอบของอาหารตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.3 โดยจะเตรียมอาหารที่มีความแตกต่างกัน 2 สูตร คือ สูตรที่หนึ่งนั้นจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกหนึ่งสูตรจะใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน นำอาหารทั้งสองสูตรไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 45 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงในฟลาสก์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 มิลลิลิตร เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักแบบใช้ถังหมัก

โดยจะเตรียมอาหารที่มีความแตกต่างกัน 2 สูตร คือ สูตรที่หนึ่งจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับอีกหนึ่งสูตรใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน นำอาหารทั้งสองสูตรไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งอัดไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 95 มิลลิลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงในฟลาสก์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาสก์ เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.6 กระบวนการหมัก

3.6.1 กระบวนการหมักในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง

ในการทดลองจะทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 45 มิลลิลิตรในสภาวะนิ่ง โดยทำการลงเชื้อจาก Pre-culture ที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.5.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 0 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมงโดยในแต่ละชั่วโมงจะเก็บตัวอย่างมาชั่วโมงละ 3 ฟลาสก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

3.6.2 กระบวนการหมักในถังหมักสภาวะไม่ใช้ใบพัด

เตรียมอาหาร GYCC 2 สูตร คือสูตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งไนโตรเจนและสูตรที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำมาถังหมักที่มีอาหารอยู่ภายในที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาต่อเข้ากับปั๊ม เครื่องทำความเย็น (cooling) ตั้งอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อทำให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ หลังจากนั้นทำการลงเชื้อจาก Pre – culture ที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 3.5.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.3 กระบวนการหมักในถังหมักสภาวะที่ใช้ใบพัด

ทำการเตรียมการอาหารและ Pre-culture รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการหมักให้เหมือนกับหัวข้อ 3.6.2 แต่เพิ่มสภาวะการกวนเข้าไป โดยทำการกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.7 วิธีการหาจำนวนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ที่มีชีวิตอยู่

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากชั่วโมงต่างๆ มาทำการวิเคราะห์โดยวิธีการ Pour plate โดยปิเปตตัวอย่างมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} 10^{-4}และ10^{-6} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ เติมอาหาร NA ที่อุ่น (อุณหภูมิ 44 – 46 องศาเซลเซียส) ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างแล้ว

ประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อดังภาพแล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว คว่ำจานลง ถ้วยบ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานับจำนวนโคโลนีบนจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25 – 300 โคโลนี นำจำนวนเชื้อทั้งสามจานมาหาค่าเฉลี่ยและรายงานผลให้ในรูปของ CFU ต่อมิลลิลิตร

3.8 วิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์

3.8.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 30 20 และ10 เท่า ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี DNS โดยดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ มา 1 มิลลิลิตร เติม DNS 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นเติมน้ำกลั่นปริมา 6 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาเพิ่มเติมได้ในภาคผนวก ก

3.8.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอื่นๆ

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในหัวข้อ 3.8.1 นำมาเจือจางให้ได้สารที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอนให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิตริกและกรดบิวทิว-เรตด้วยเครื่อง HPLC (Aginlant 1200) โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion ขนาด Particle size 9 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้ คือสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน คอลัม (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง ใช้ Run time 40 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.8.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

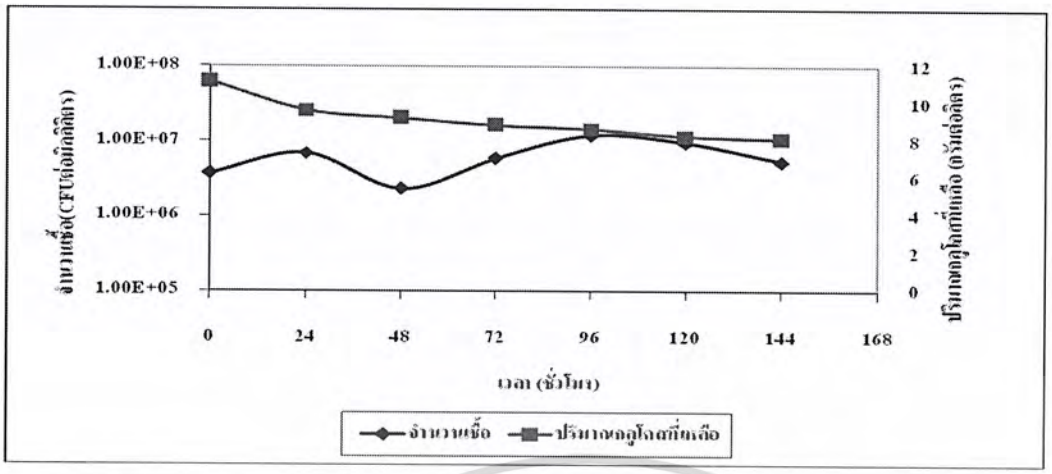
4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์

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

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

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุด เมื่อการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 96 ชั่วโมง ได้ 1.20×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันมากเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีค่าสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

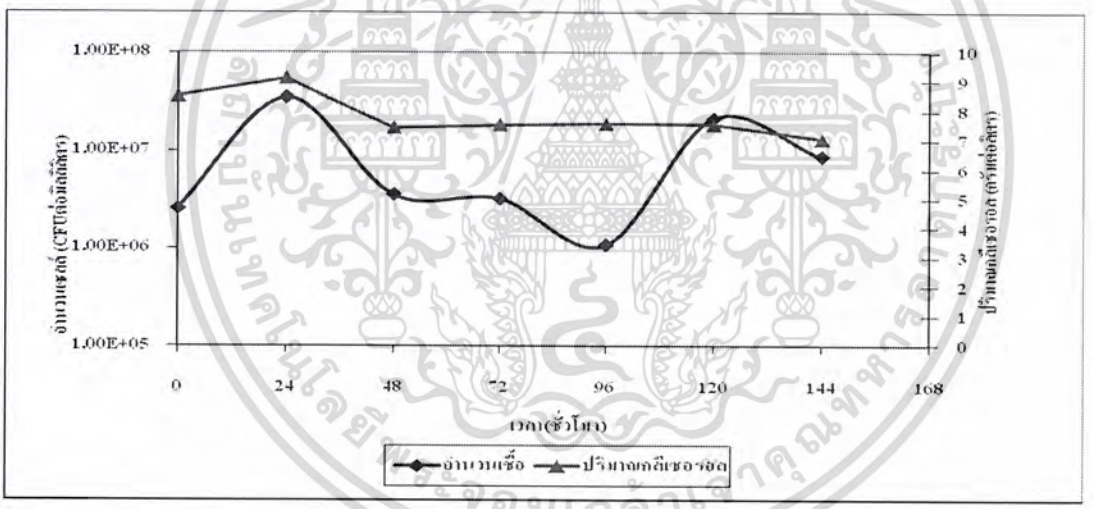
ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



รูปที่ 4.2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.57 \pm 2.20\times10^{6})^{b}$	$(8.52 \pm 0.08)^{a}$
24	$(3.47 \pm 1.60\times10^{7})^{a}$	$(9.12 \pm 0.55)^{a}$
48	$(3.56 \pm 3.38\times10^{6})^{b}$	$(7.45 \pm 0.02)^{b}$
72	$(3.23 \pm 1.50\times10^{6})^{b}$	$(7.55 \pm 0.03)^{b}$
96	$(1.10 \pm 1.57\times10^{6})^{b}$	$(7.60 \pm 0.09)^{b}$
120	$(2.16 \pm 3.35\times10^{7})^{ab}$	$(7.57 \pm 0.92)^{b}$
144	$(8.73 \pm 3.78\times10^{6})^{ab}$	$(7.07 \pm 0.76)^{b}$

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

จากรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดนับได้ 3.47×10^{7} CFUต่อมิลลิลิตร แต่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 120 และ 144 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.16×10^{7} และ 8.73×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยดังจะเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งมีค่าสูงเหมือนกรณีการใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยง นั่นคือเชื้อ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ส่วนการใช้กลีเซอรอลของเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตจะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถใช้กลีเซอรอลได้ โดยกลี- เซอรอลลดลงทั้งหมด 2.05 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ปริมาณกลีเซอรอลมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ปริมาณกลีเซอรอลในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมงมีค่าลดลงไม่มากจากปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น ส่วนผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC (ไม่ได้นำมาแสดง) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆ ทั้งอะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

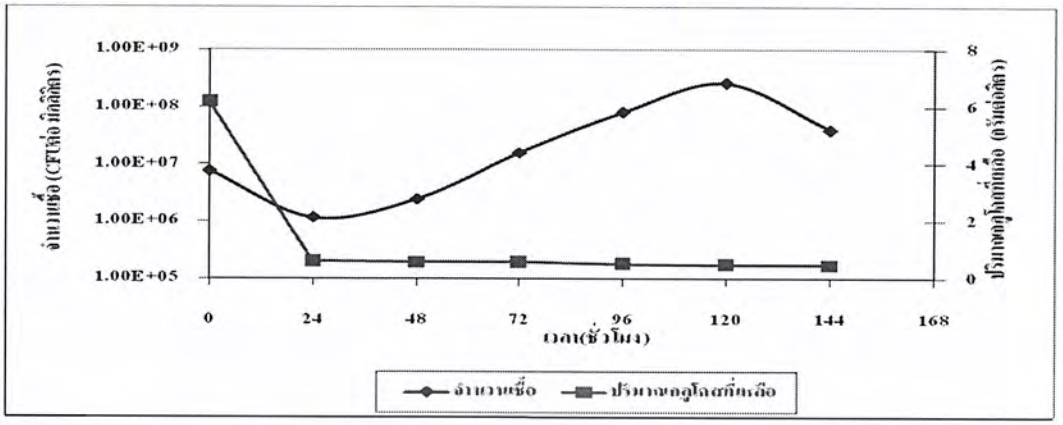
เนื่องจากการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากันของเชื้อทั้ง 3 ฟลาสก์ จึงได้มีการทดลองในระดับ ถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไร้ออกซิเจนแน่นอน โดยในขั้นแรกจะทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสกับที่ใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว และในขั้นตอนต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดซึ่งมีอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.2.1 การเจริญเติบโตและการผลิตสารอินทรีย์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* แบบไม่ใช้ใบพัด

จากรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัดโดยมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่ 24 มีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.16×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดการปรับตัวภายในถังหมัก และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.60×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากชั่วโมงอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.18 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดนั้นปริมาณกลูโคสเหลือเพียง 0.48 กรัมต่อลิตร เท่ากับมีการใช้น้ำตาลไป 5.7 กรัมต่อลิตร กล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณน้ำตาลกลูโคสแปรผันกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

ตารางที่ 4.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 เอทานอลและ1,3-โพรเพนไดออล 0.031 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้จากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.4

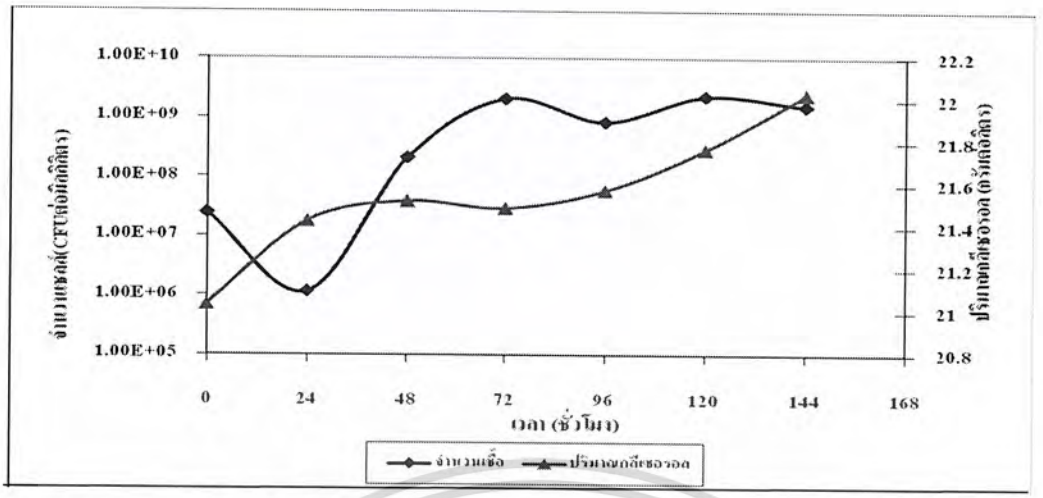
จากรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัดนั้น พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตลดลงเหมือนกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 4.43 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 0 ไปเป็น 1.16 $\times 10^5$ CFUต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์กลับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.24 $\times 10^8$ CFUต่อมิลลิลิตร การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการสังเกตที่ค่าพี-เอช (pH) พบว่า ค่าพีเอช (pH) ที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.67 และเพิ่มขึ้นเป็น 6.98 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 พีเอช (pH) มีค่าลดลง แสดงว่ามีการสร้างกรดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.4 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม

ที่มา : Biebl และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

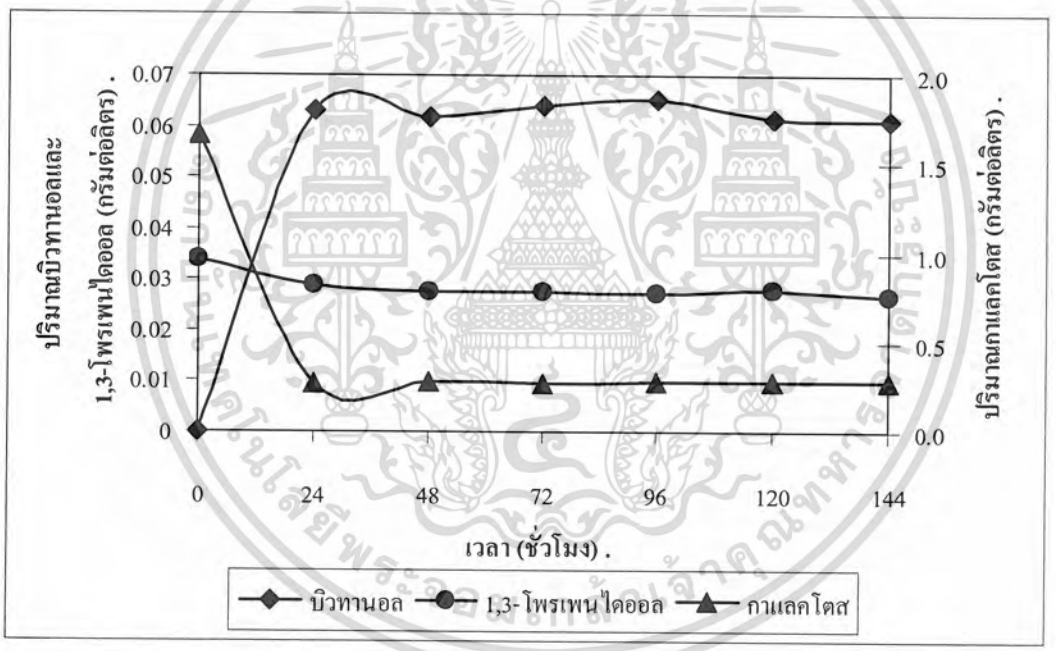
ตารางที่ 4.4 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์จาก รูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.5 จะพบบิวทานอลเฉลี่ยประมาณ 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 144 นอกจากนี้ยังพบ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยประมาณ 0.029 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และยังพบกาแลคโตสซึ่งมีปริมาณลดลงจาก 1.662 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเหลือเป็นประมาณ 0.275 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงและมีปริมาณคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเจริญเติบโตและการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้ออาจมาจากกาแลค-โตสในเคซีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร GYCC



รูปที่ 4.6 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

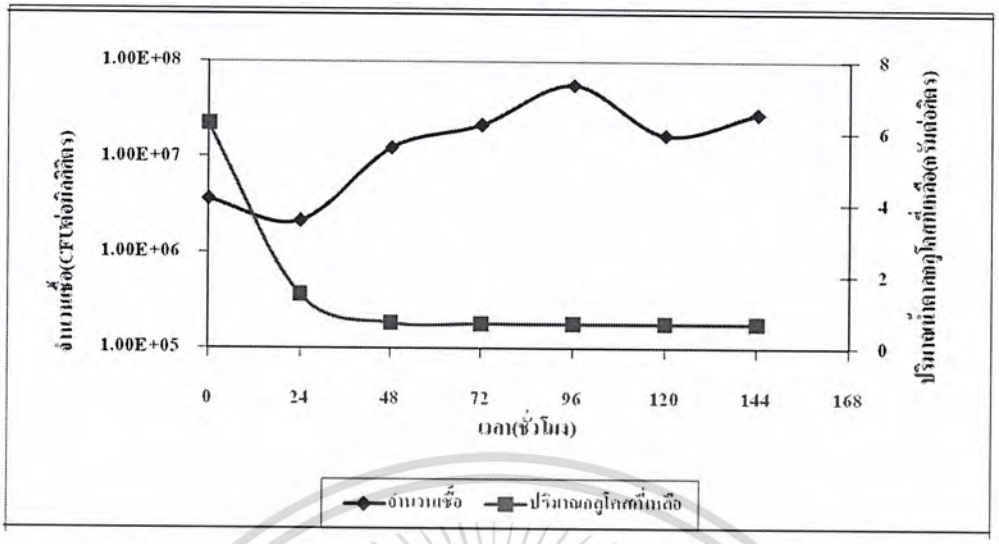
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.034 ±0.000[a]	1.662 ±0.043[a]
24	0.063 ±0.006[a]	0.029 ±0.001[b]	0.275 ±0.003[b]
48	0.062 ±0.004[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
72	0.064 ±0.002[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
96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

4.2.2 การเจริญเติบโตและการผลิตสารอินทรีย์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* แบบใช้ใบพัด

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.6 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงแรกของการเจริญจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญลดลงจาก 3.66×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 2.16×10^{5} CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.68 เป็น 4.87 ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคู่ไปกับปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกันจนมีค่าความเข้มข้นเหลือเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์*Clostridium acetobutylicum* และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด
(◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

แต่ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อไม่สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 5.73 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.84 และในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.71 $\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีน้อย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชั่วโมงที่ 96 และ 120 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนถึงชั่วโมงที่ 144 เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(3.66\pm5.80\times10^6)^b$	6.267	6.68
24	$(2.16\pm0.67\times10^6)^b$	1.500	4.87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

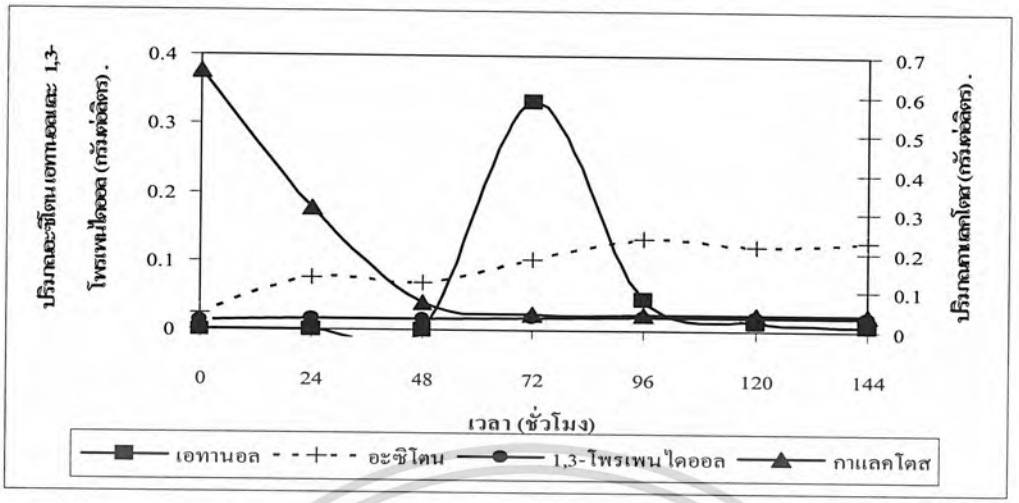
ตารางที่ 4.6(ต่อ) การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

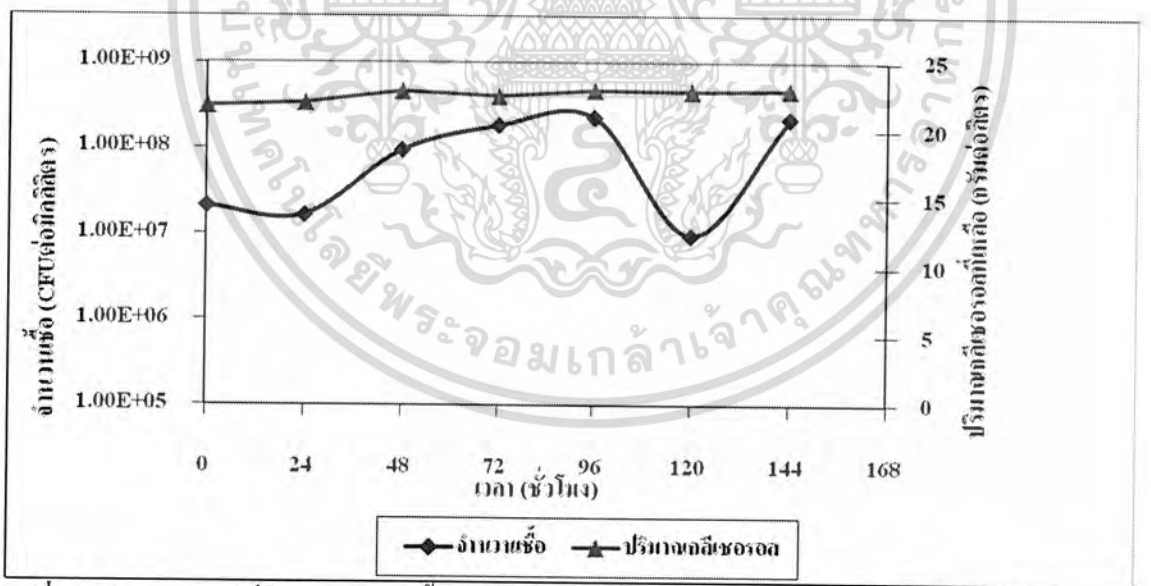
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.024 ±0.003 ^{c}	0.013 ±0.001 ^{b}	0.661 ±0.001 ^{a}
24	0	0.076 ±0.047 ^{b}	0.017 ±0.004 ^{a}	0.314 ±0.030 ^{b}
48	0	0.069 ±0.039 ^{b}	0.017 ±0.003 ^{a}	0.074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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC 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 4.9 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

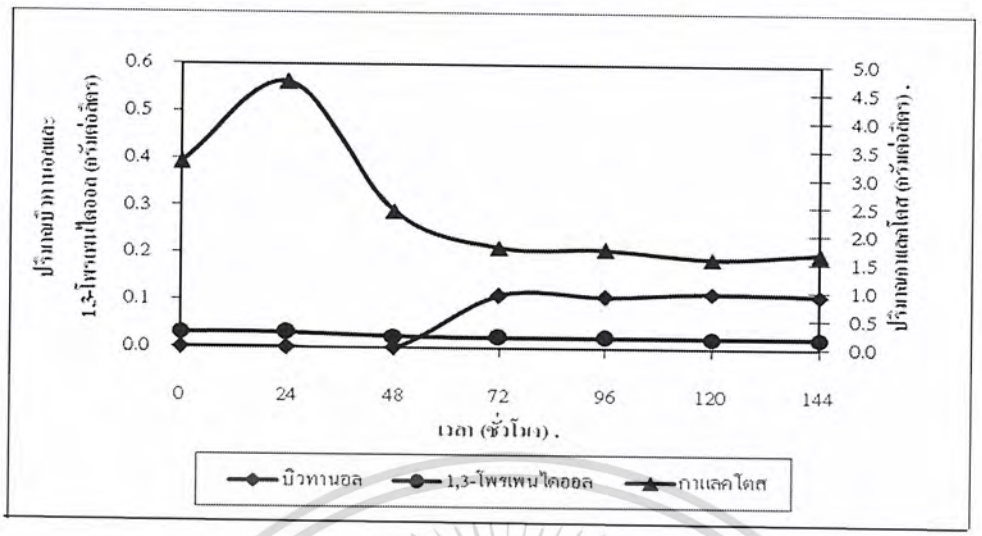
ตารางที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารสูตร GYCC พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 2.25×10^{8} CFUต่อมิลลิลิตร และเชื้อมีจำนวนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.8 ส่วนค่าพีเอช (pH) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.9 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC เริ่มพบบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงเข้มข้น 0.027 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 0.112 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบเอทานอลและอะซิโตน ซึ่งจำนวนเชื้อที่มีชีวิตและปริมาณบิวทานอลมีแนวโน้มสอดคล้องไปกับการใช้น้ำตาลกาแลคโตส ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3.272 กรัมต่อลิตรลดลงเป็น 1.753 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เชื้อมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ 1.20 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร แปรผันกันกับปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลือเท่ากับ 8.10 กรัมต่อลิตร และการทดลองที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 3.47 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณกลีเซอรอลแปรผกผันกับจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ใช้ปริมาณ กลีเซอรอลไป 1.45 กรัมต่อลิตร จากชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 8.52 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 7.07 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลีเซอรอล เพราะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ผลิตได้เท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรและผลิตโพรเพนไดออลในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.029 กรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของเชื้อจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 มีการเจริญเติบโตลดลงซึ่งขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.73 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตรและในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตบิวทานอลแต่มีการผลิตอะซิโตนในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรและเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเท่ากับ 0.333 กรัมต่อลิตร ปริมาณของเอทานอลลดลงเนื่องจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 2.25 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.027 กรัมต่อลิตรและผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณที่ผลิตได้ คือ 0.025 กรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทำวิจัยในครั้งต่อไปควรที่จะทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สายพันธุ์อื่น เนื่องจากในงานวิจัยนี้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณที่น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

พัฒนา เหล่าไพบูลย์. 2549. การผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ด้วยวิธีการหมักแบบกะและกึ่งกะ. คณะเทคโนโลยี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น

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

มาตรฐานการผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกลีเซอรีนบริสุทธิ์ มอก. 377-2538 (2538)

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

วิชัย ลีลาวัชรมาศ, ลักขณา เหล่าไพบูลย์, ประสิทธิ์ ใจศิล. 2548. คณะเทคโนโลยี ทำการศึกษา การผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* และ*Clostridium beijerinkii*

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. หน้า 93-113

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

Andreesen, JR, Bahl, H, and Gottschalk, G.1989. Introduction to the physiology and biochemistry of the genus *Clostridium*. In: Minton NP, Clarke BJ, 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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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

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

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

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

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

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

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.

Van Der Westhuizen, A, Jones DT, Woods DR. 1982. Autolytic activity and butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum.* Appl Environ Microbiol. 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.

[Online]. Available : http://thaimisc.pukpik.com/freewebboard/php/vreply.php?user=alls&topic =668&page=1 (20กันยายน2553)

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

[Online]. Available : http://www.researchgate.net/publication/27807181 (20กันยายน2553)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available : http://www.foodindustrythailand.com/v17/index.php?option=com_content&view=article&id=531&Itemid=132 (21กันยายน2553)

[Online]. Available : http://www.energyfantasia.com/ef4/pedia/pediashow.php?show=402 (21กันยายน2553)

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

[Online]. Available :http://www.weekendhobby.com/offroad/newenergy/Question.asp?ID=1684 (23 กันยายน 2553)

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

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

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

[Online]. Available : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (25 กันยายน 2553)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน

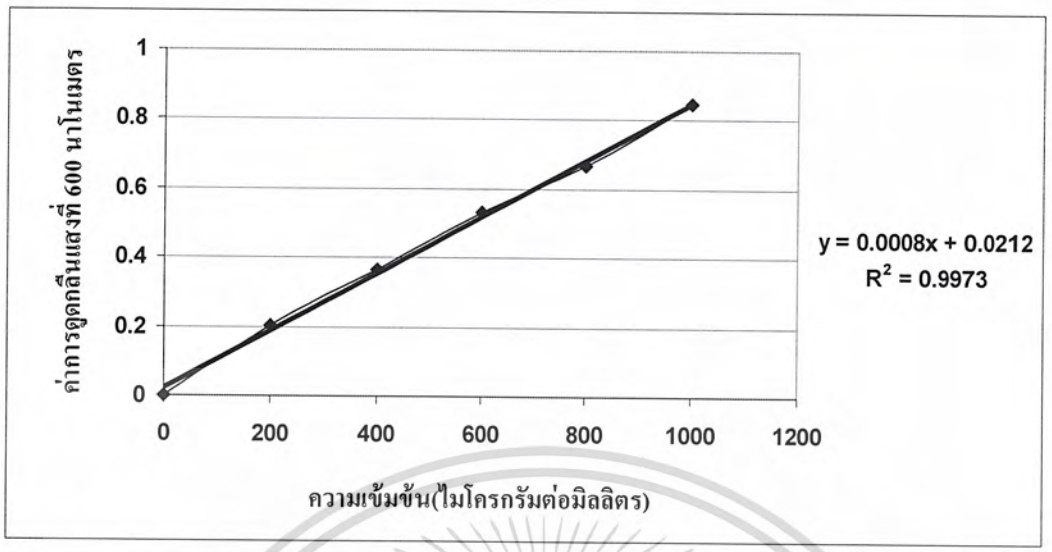
การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

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

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

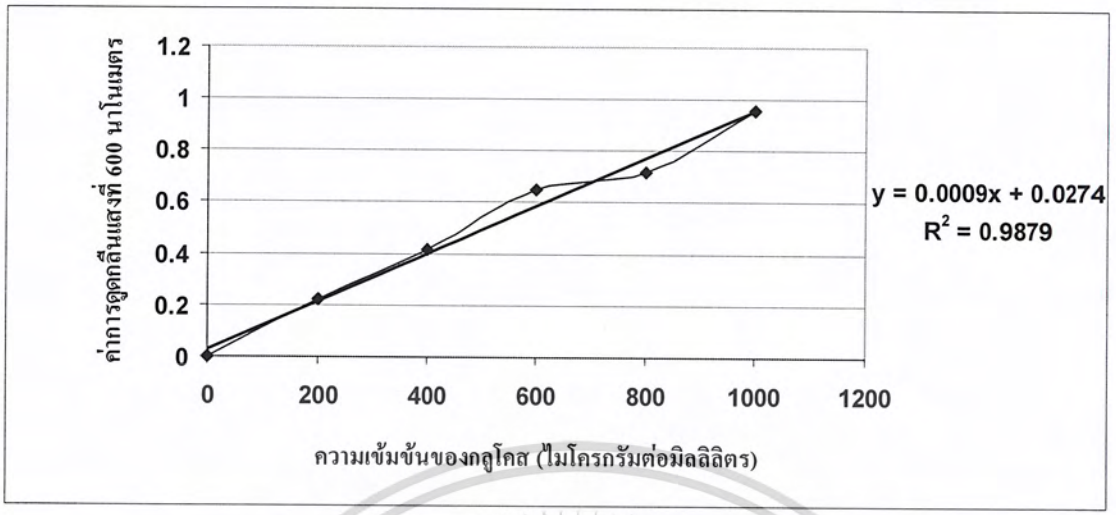


รูปที่ ก. 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

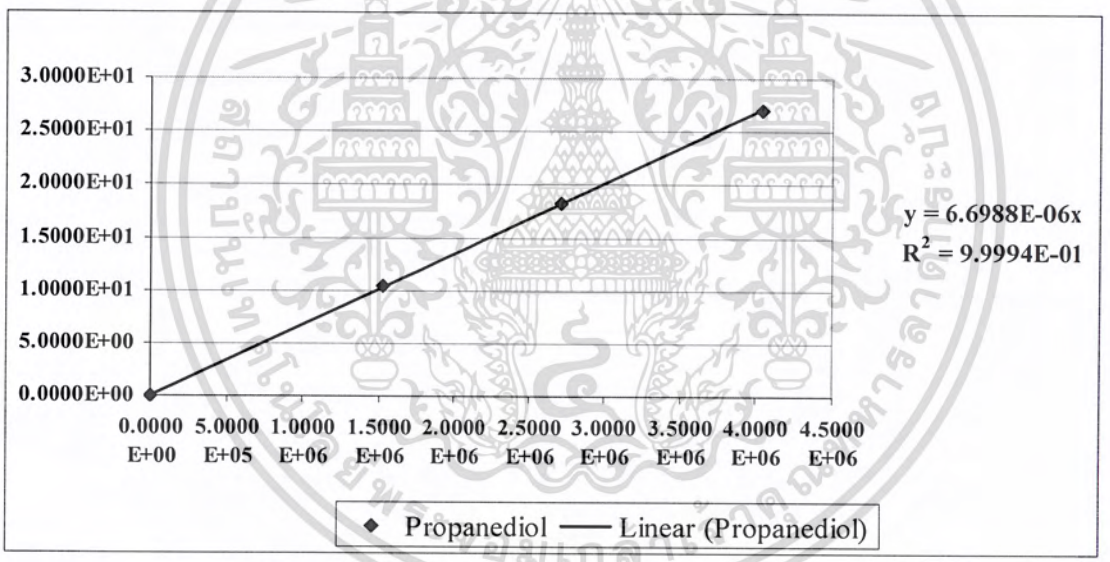
ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



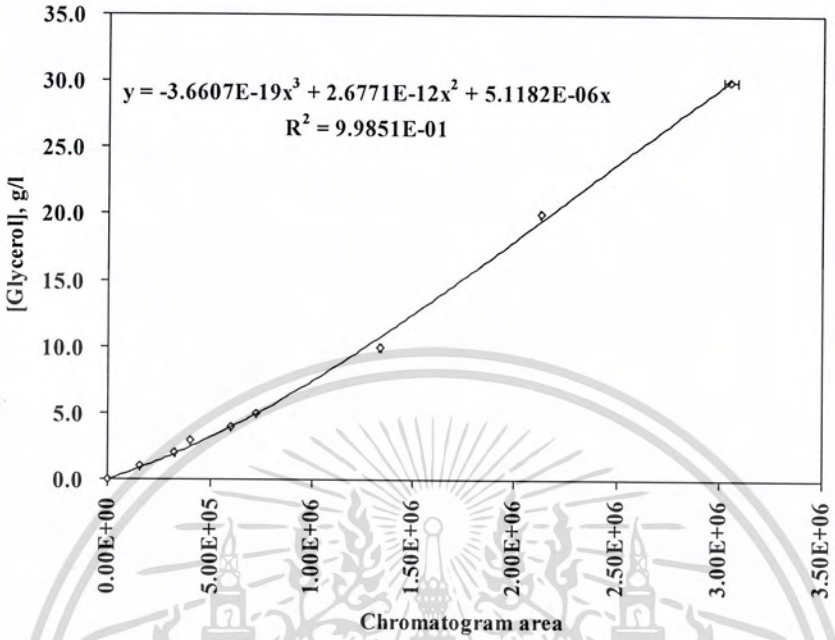
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส



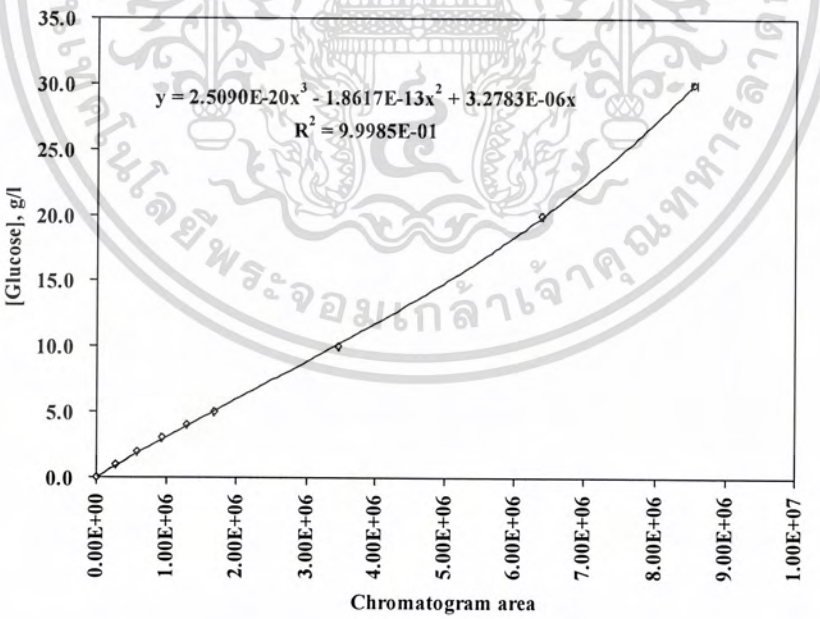
รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของ 1,3-propanediol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานของสารต่างๆ จากการวิเคราะด้วยเครื่อง HPLC

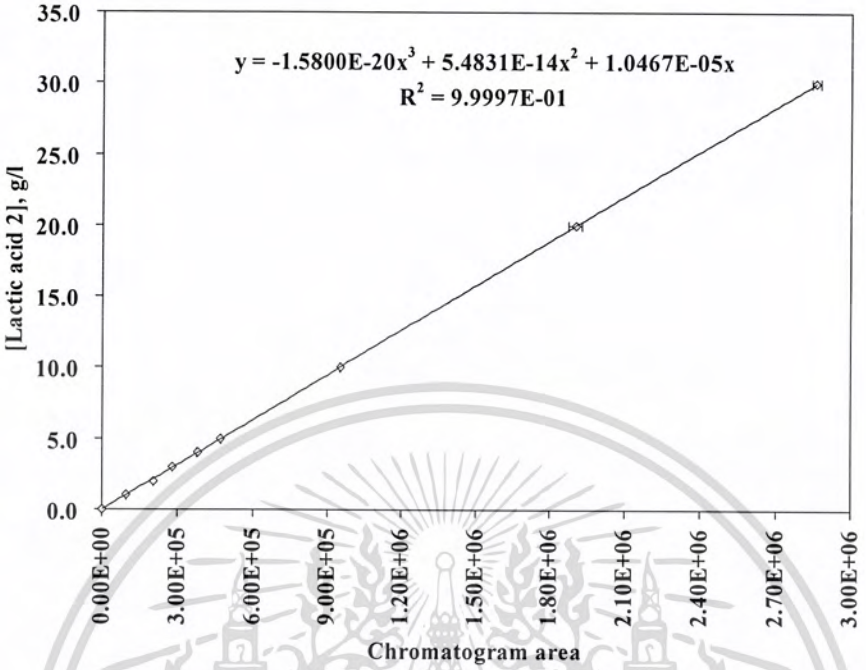


รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

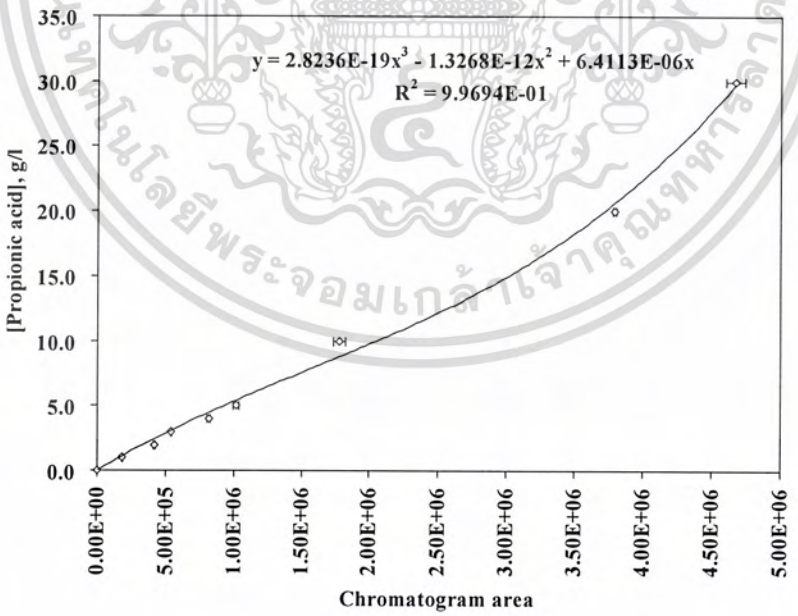


รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

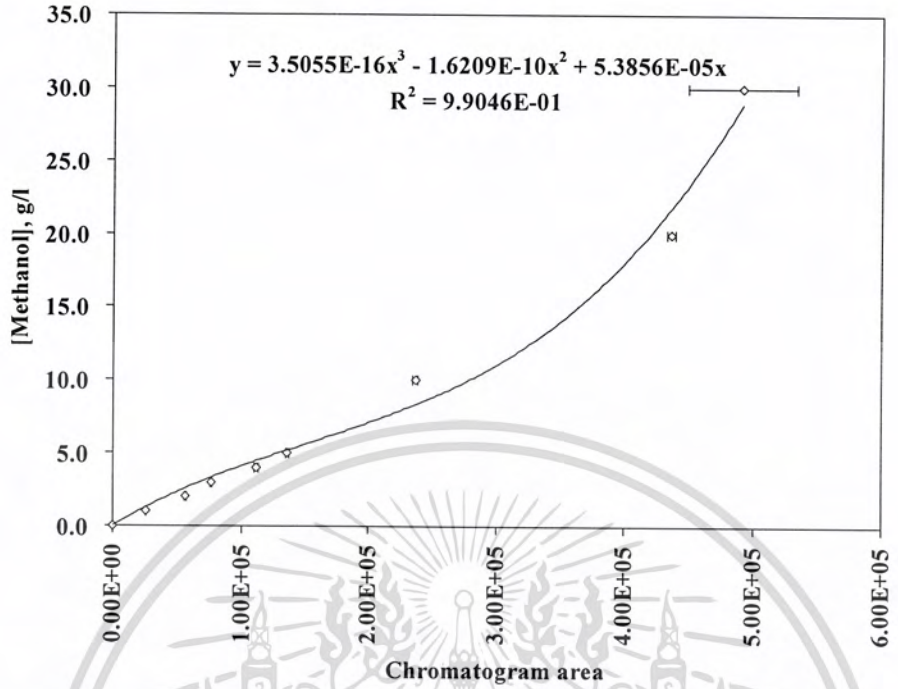


รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

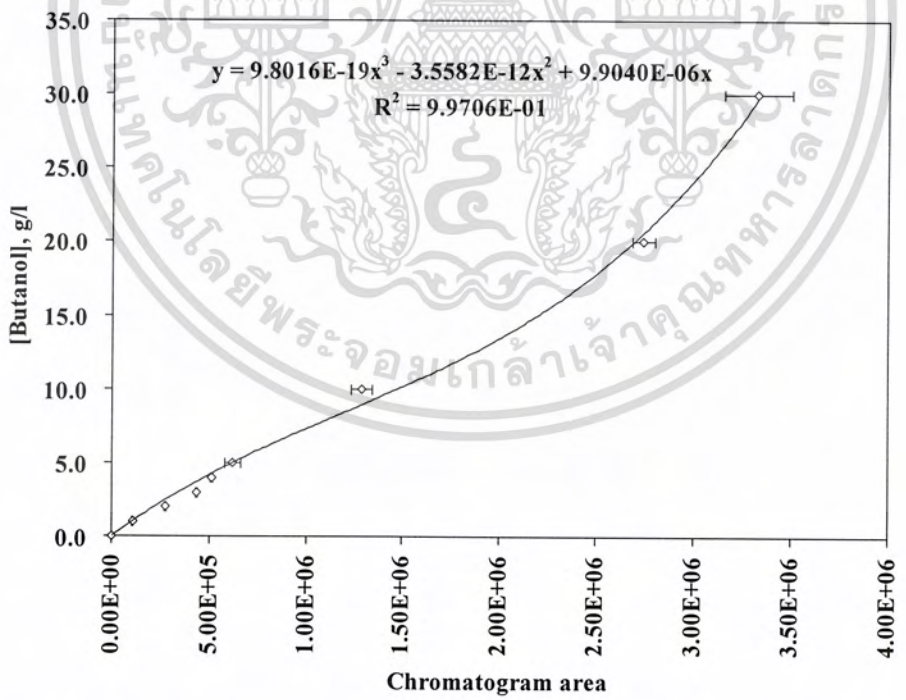


รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาโอนิคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

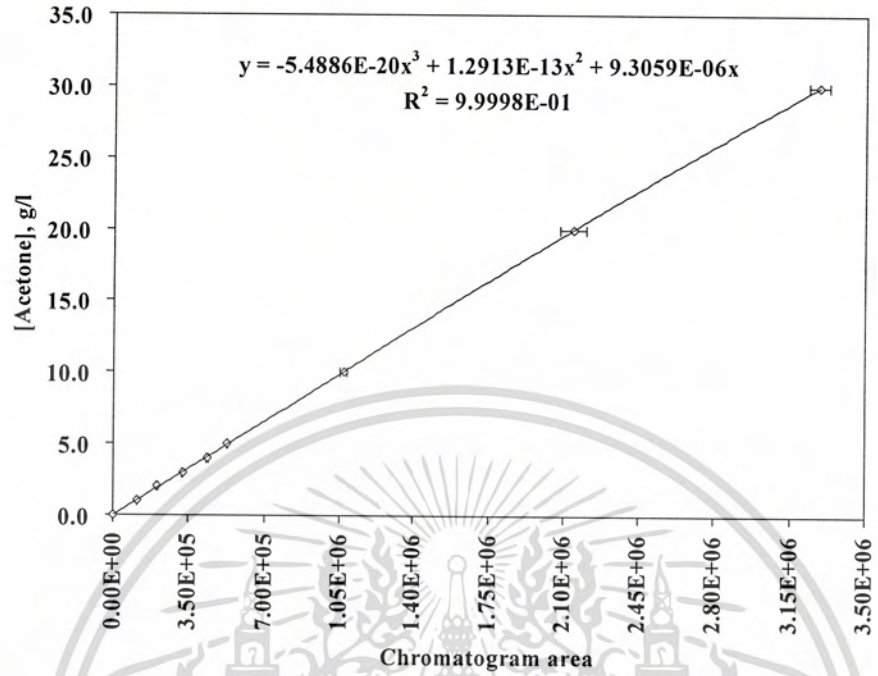


รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

Oneway

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

CFU/ml

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

CFU/ml

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

CFU/ml

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.800.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 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]					
		Subset for alpha = 0.05			
Glycerol	N	1	2	3	4
0 hour	3	21.0367			
24 hour	3		21.4300		
72 hour	3		21.4900		
48 hour	3		21.5233		
96 hour	3		21.5733	21.5733	
120 hour	3			21.7667	
144 hour	3				22.0267
Sig.		1.000	.241	.096	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

Oneway

Descriptives

กรัมต่อลิตร

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

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ ค.1 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
0	10^{-3}	260	2.60×10^{6}
	10^{-3}	493	4.93×10^{6}
	10^{-3}	289	2.89×10^{6}
	10^{-4}	30	3.00×10^{6}
	10^{-4}	51	5.10×10^{6}
24	10^{-3}	410	4.10×10^{6}
	10^{-3}	400	4.00×10^{6}
	10^{-4}	106	1.06×10^{7}
	10^{-4}	88	8.80×10^{6}
48	10^{-3}	215	2.15×10^{6}
	10^{-3}	226	2.26×10^{6}
	10^{-3}	254	2.54×10^{6}
72	10^{-4}	17	1.70×10^{6}
	10^{-4}	4	4.00×10^{5}
	10^{-4}	5	5.00×10^{5}
	10^{-5}	6	6.00×10^{6}
	10^{-5}	25	2.50×10^{7}
	10^{-5}	2	2.00×10^{6}
96	10^{-3}	28	2.80×10^{5}
	10^{-4}	46	4.60×10^{6}
	10^{-5}	31	3.10×10^{7}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
120	10^{-3}	400	4.00×10^{6}
	10^{-4}	117	1.17×10^{7}
	10^{-5}	13	1.30×10^{7}
144	10^{-3}	156	1.56×10^{6}
	10^{-4}	91	9.10×10^{6}

ตารางที่ ค.2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
0	10^{-3}	511	5.11×10^{6}
	10^{-3}	140	1.40×10^{6}
	10^{-4}	12	1.20×10^{6}
24	10^{-4}	307	3.07×10^{7}
	10^{-4}	210	2.10×10^{7}
	10^{-4}	523	5.23×10^{7}
48	10^{-3}	189	1.89×10^{6}
	10^{-3}	51	5.10×10^{5}
	10^{-3}	44	4.40×10^{5}
	10^{-4}	93	9.30×10^{6}
	10^{-4}	44	4.40×10^{6}
	10^{-4}	48	4.80×10^{6}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
72	10^{-4}	49	4.90×10^{6}
	10^{-4}	20	2.00×10^{6}
	10^{-4}	28	2.80×10^{6}
96	10^{-2}	281	2.10×10^{5}
	10^{-2}	152	1.52×10^{5}
	10^{-4}	29	2.90×10^{6}
120	10^{-4}	20	2.00×10^{6}
	10^{-4}	22	2.20×10^{6}
	10^{-4}	36	3.60×10^{6}
	10^{-6}	8	8.00×10^{7}
	10^{-6}	2	2.00×10^{7}
144	10^{-4}	96	9.60×10^{6}
	10^{-4}	128	1.20×10^{7}
	10^{-4}	46	4.60×10^{6}

ตารางที่ ค.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
0	10^{-3}	50	5.00×10^{5}
	10^{-3}	74	7.40×10^{5}
	10^{-3}	103	1.03×10^{6}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3(ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
24	10^{-3}	143	1.43×10^{6}
	10^{-3}	132	1.32×10^{6}
	10^{-3}	73	7.30×10^{5}
48	10^{-4}	26	2.60×10^{6}
	10^{-4}	18	1.80×10^{6}
	10^{-4}	29	2.90×10^{6}
72	10^{-4}	90	9.00×10^{6}
	10^{-4}	227	2.27×10^{7}
96	10^{-5}	46	4.60×10^{7}
	10^{-5}	52	5.20×10^{7}
	10^{-5}	143	1.43×10^{8}
120	10^{-5}	214	2.14×10^{8}
	10^{-5}	244	2.44×10^{8}
	10^{-5}	214	2.14×10^{8}
	10^{-6}	28	2.80×10^{8}
	10^{-6}	35	3.50×10^{8}
144	10^{-5}	43	4.30×10^{7}
	10^{-5}	40	4.00×10^{7}
	10^{-5}	35	3.50×10^{7}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบวางนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
0	10^{-4}	204	2.04×10^{7}
	10^{-4}	288	2.88×10^{7}
	10^{-4}	236	2.36×10^{7}
24	10^{-3}	143	1.43×10^{6}
	10^{-3}	132	1.32×10^{6}
	10^{-3}	73	7.30×10^{5}
48	10^{-5}	161	1.61×10^{8}
	10^{-5}	250	2.50×10^{8}
	10^{-5}	212	2.12×10^{8}
72	10^{-6}	272	2.72×10^{9}
	10^{-6}	132	1.32×10^{9}
	10^{-6}	206	2.06×10^{9}
96	10^{-6}	87	8.70×10^{8}
	10^{-6}	80	8.00×10^{8}
	10^{-6}	81	8.10×10^{8}
120	10^{-6}	214	2.14×10^{9}
	10^{-6}	244	2.44×10^{9}
	10^{-6}	214	2.14×10^{9}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบวางนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
144	10^{-6}	173	1.73×10^{9}
	10^{-6}	157	1.57×10^{9}
	10^{-6}	131	1.31×10^{9}

ตารางที่ ค.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
0	10^{-3}	288	2.88×10^{6}
	10^{-3}	236	2.36×10^{6}
	10^{-3}	14	1.40×10^{5}
	10^{-4}	7	7.00×10^{5}
	10^{-4}	6	6.00×10^{5}
	10^{-4}	153	1.53E+07
24	10^{-3}	198	1.98×10^{6}
	10^{-3}	255	2.55×10^{6}
	10^{-4}	13	1.30×10^{6}
	10^{-4}	28	2.80×10^{6}
48	10^{-3}	114	1.14×10^{6}
	10^{-4}	96	9.60×10^{6}
	10^{-5}	27	2.70×10^{7}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml
72	10^{-4}	228	2.28×10^{7}
	10^{-5}	27	2.70×10^{7}
	10^{-5}	16	1.60×10^{7}
96	10^{-4}	195	1.95×10^{7}
	10^{-5}	95	9.50×10^{7}
120	10^{-4}	116	1.16×10^{7}
	10^{-5}	17	1.17×10^{7}
	10^{-5}	28	2.80×10^{7}
144	10^{-3}	119	1.19×10^{6}
	10^{-4}	130	1.30×10^{7}
	10^{-4}	29	2.90×10^{6}
	10^{-5}	97	9.70×10^{7}

ตารางที่ ค.6 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml	pH
0	10^{-4}	202	2.02×10^{7}	6.68
	10^{-4}	252	2.52×10^{7}	
	10^{-4}	178	1.78×10^{7}	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.6(ต่อ) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISIR 1426 ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	colony	CFU/ml	pH
24	10^{-4}	153	1.53×10^{7}	6.44
	10^{-4}	198	1.98×10^{7}	
	10^{-4}	145	1.45×10^{7}	
48	10^{-4}	196	1.96×10^{7}	6.98
	10^{-4}	318	3.18×10^{7}	
	10^{-4}	203	2.03×10^{7}	
	10^{-5}	144	1.44×10^{8}	
	10^{-5}	235	2.35×10^{8}	
	10^{-5}	112	1.12×10^{8}	
72	10^{-5}	250	2.50×10^{8}	6.98
	10^{-5}	115	1.15×10^{8}	
96	10^{-5}	253	2.53×10^{8}	6.9
	10^{-5}	179	1.79×10^{8}	
	10^{-5}	244	2.44×10^{8}	
120	10^{-4}	31	3.10×10^{6}	6.9
	10^{-5}	16	1.60×10^{7}	
144	10^{-5}	196	1.96×10^{8}	6.98
	10^{-5}	203	2.03×10^{8}	
	10^{-5}	253	2.53×10^{8}	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่งในอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	ค่าการดูดกลืนแสง
0	30X	0.367 0.325 0.318
24	20X	0.322 0.338 0.293
48	20X	0.311 0.336 0.217
72	20X	0.378 0.349 0.341
96	20X	0.470 0.372 0.366
120	20X	0.369 0.540 0.400
144	20X	0.419 0.371 0.337

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบวางนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	ค่าการดูดกลืนแสง
0	20X	0.281 0.279 0.276
24	Non	0.484 0.534 0.588
48	Non	0.454 0.443 0.408
72	Non	0.517 0.440 0.553
96	Non	0.425 0.413 0.389
120	Non	0.460 0.522 0.513
144	Non	0.437 0.446 0.426

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา(ชั่วโมง)	dilution	ค่าการดูดกลืนแสง
0	20X	0.284 0.296 0.279
24	10X	0.143 0.197 0.126
48	Non	0.602 0.609 0.604
72	Non	0.560 0.641 0.683
96	Non	0.653 0.624 0.590
120	Non	0.621 0.290 0.598
144	Non	0.639 0.634 0.630

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 10 ปริมาณกลีเซอรอลและกรดแลคติกที่พบในการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
0	8.55	1.4538
0	8.62	1.4633
0	8.67	1.4968
24	8.58	1.4475
24	8.65	1.2966
24	8.43	1.3564
48	8.82	1.7169
48	8.40	1.6436
48	8.41	1.6394
72	8.43	1.6299
72	8.46	1.6415
72	8.55	1.6247
96	8.50	1.6289
96	8.58	1.6341
96	8.57	1.6446
120	8.76	1.6645
120	8.65	1.6813
120	8.52	1.6352

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 10 (ต่อ) ปริมาณกลีเซอรอลและกรดแลคติกที่พบในการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง ในอาหาร GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
144	8.70	1.6656
144	8.59	1.6436
144	7.28	1.7610

ตารางที่ ค. 11 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Ethanol]
0	-	-
0	-	-
0	-	-
24	-	-
24	-	-
24	-	-
48	-	-
48	-	-
48	-	-
72	-	-
72	-	-
72	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 11 (ต่อ) ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Ethanol]
96	-	-
96	-	-
96	-	-
120	-	-
120	-	-
120	-	-
144	0.047	0.233
144	0.022	0.151
144	0.023	0.157

ตารางที่ ค. 12 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Butanol]	[Galactose]
0	0.034	-	1.640
0	0.034	-	1.634
0	0.034	-	1.711
24	0.029	0.065	0.271
24	0.028	0.061	0.276
24	0.029	0.058	0.277

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 12 (ต่อ) ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Butanol]	[Galactose]
48	0.028	0.056	0.278
48	0.028	0.064	0.275
48	0.027	0.065	0.276
72	0.028	0.066	0.274
72	0.028	0.064	0.278
72	0.027	0.062	0.276
96	0.027	0.068	0.275
96	0.028	0.064	0.277
96	0.027	0.064	0.278
120	0.028	0.064	0.280
120	0.028	0.060	0.279
120	0.028	0.060	0.278
144	0.027	0.061	0.282
144	0.026	0.060	0.281
144	0.027	0.062	0.283

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 13 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร) ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Galactose]	[Ethanol]	[Acetone]
0	0.014	0.660	-	0.028
0	0.012	0.654	-	0.022
0	0.012	0.669	-	0.023
24	0.012	0.649	-	0.022
24	0.020	0.149	-	0.104
24	0.019	0.145	-	0.103
48	0.020	0.157	-	0.114
48	0.015	0.032	-	0.046
48	0.015	0.032	-	0.047
72	0.019	0.039	0.349	0.107
72	0.019	0.038	0.337	0.105
72	0.019	0.039	0.314	0.099
96	0.021	0.038	0.047	0.146
96	0.020	0.039	0.043	0.125
96	0.020	0.039	0.045	0.131
120	0.020	0.039	0.012	0.122
120	0.020	0.039	0.012	0.123
120	0.020	0.039	0.013	0.126
144	0.020	0.039	0.004	0.125
144	0.020	0.040	0.004	0.125
144	0.021	0.036	0.013	0.140

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค. 14 ปริมาณสาร(กรัมต่อลิตร)ที่พบในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่สภาวะกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

เวลา(ชั่วโมง)	[Propanediol]	[Butanol]	[Galactose]
0	0.247	-	0.000
0	0.245	-	4.854
0	0.247	-	4.964
24	0.236	-	4.412
24	0.248	-	4.803
24	0.247	-	4.865
48	0.182	-	2.253
48	0.182	-	2.217
48	0.185	0.626	2.751
72	0.181	0.868	1.940
72	0.172	0.880	1.695
72	0.163	0.861	1.706
96	0.169	0.864	1.719
96	0.171	0.836	1.820
96	0.171	0.847	1.721
120	0.168	0.845	1.774
120	0.163	0.887	1.371
120	0.161	1.005	1.625
144	0.165	0.879	1.714
144	0.168	0.862	1.657
144	0.169	0.888	1.666

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้