สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinkii*

Production of Biobutanol Using *Clostridium beijerinckii*

T117165

วรรณิศา อินต๊ะสุข

วันเพ็ญ วิตา

วีรวรรณ จันจินะ

สชหมู่.....
เลขทะเบียน.....117165
วัน,เดือน,ปี.....19 ก.ค. 2554

b.....123A2215
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF BIOBUTANOL USING *CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII*

WANNISA INTASUK

WANPEN WITA

WEERAWAN JANTINA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACEDEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinkii*

Production of Biobutanol Using *Clostridium beijerinckii*

นักศึกษา วรรณิศา อินต๊ะสุข รหัสนักศึกษา 50050864

วันเพ็ญ วิตา รหัสนักศึกษา 50050866

วีรวรรณ จันจินะ รหัสนักศึกษา 50050869

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ รศ.ดร.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinkii*
	Production of Biobutanol Using *Clostridium beijerinkii*
ชื่อนักศึกษา	วรรณิศา อินต๊ะสุข
	วันเพ็ญ วิตา
	วีรวรรณ จันจินะ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 ทดแทนกลูโคสเพื่อการผลิตบิวทานอล โดยทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต พบว่าเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนเซลล์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวน 8.33 x10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับการเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าการใช้กลูโคสมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 24 เป็นจำนวน 3.93 x10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และการใช้กลีเซอรอลพบจำนวนเซลล์มากที่สุด ชั่วโมงที่ 168 เป็นจำนวน 4.78 x10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำส่วนใสของตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล พบว่า เมื่อเติมกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ: บิวทานอล การหมักในสภาวะไร้อากาศ เชื้อ *Clostridium beijericnkii* กลีเซอรอล

Title	Production of Biobutanol Using *Clostridium beijerinkii*
Student	Wannisa Intasuk
	Wanpen Wita
	Weerawan Janjina
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

ABSTRACT

To study the possibility of glycerol utilization as carbon source in microbial medium, *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 was cultivated for the production of buthanol. Glycerol was by-product from transesterification (biodiesel process). The fermentation investigations were conducted in 250-ml flasks with anaerobic condition at 37 °C. Sampling was carried out every 24 hours for chemicals analysis and viable cell plate count. The addition of 60 g/l glucose to the medium resulted the maximum growth of 8.33 $x10^6$ CFU/ml at 24 hours of the cultivation, while the maximum growth of microorganism (3.93 $x10^6$ CFU/ml) was presented at 24 hours with the addition of 20 g/l glucose. The addition of 20 g/l glycerol provided 4.78 $x10^6$ CFU/ml at 168 hours. Subsequently, the supernatants of the samples were analyzed for the amount of substances occurred during fermentation by HPLC. The maximum concentration of butanol (8.11 g/l) was found in 120 hour and acetone concentration of 1.65 g/l was found in 168 hour sample with the addition of 60 g/l glucose. The addition of 20 g/l glucose gave the maximum buthanol level of 4.70 g/l and acetone concentration of 0.7927 g/l at 144 hours. The addition of 20 g/l glycerol gave the maximum buthanol level of 3.7961 g/l and acetone couldn't be discovered in the samples from the fermentation. However, ethanol couldn't be discovered in the samples from the fermentation.

Keywords: Butanol, Anaerobic fermentation, *Clostridium beijericnkii*, Glycerol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาของ ดร.วรภัทร์ สงวนไชย-ไผ่วงศ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะในการศึกษา ค้นคว้า ตลอดจนตรวจข้อแก้ไขบกพร่องต่างๆให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดี ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ผศ. ลินจง สุขลำภู และ รศ.ดร. ดวงใจ โอชัยกุล ซึ่งเป็นคณะกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะแก้ไขโครงงานพิเศษสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ผศ.ดร. นพพล เล็กสวัสดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาสารต่างๆ โดยใช้เครื่อง HPLC พร้อมทั้งวิเคราะห์ผลให้เกิดความถูกต้องยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ พี่นักวิทยาศาสตร์ทั้งตึกจุฬาภรณ์ฯ 1 และตึกวิทย์ฯ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ คุณพงษ์ศักดิ์ ประสานศักดิ์ คุณเอกภพ ภาเรือง คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง และคุณวิทยา เขียวเขินที่ได้ให้ความสะดวกและคำแนะนำในการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ในโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโทตึกจุฬาภรณ์ฯ 1 และตึกวิทย์ฯ รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ คอยให้ข้อคิดเห็นและเป็นกำลังใจตลอดมา

ที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องบุคคลอันเป็นที่รัก ตลอดจนเพื่อนๆเก่าๆทั้งหลายซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ที่คอยให้กำลังและความช่วยเหลือด้านต่างๆตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดาและผู้มีอุปการะทุกท่าน

วรรณิศา อินต๊ะสุข
วันเพ็ญ วิตา
วีรวรรณ จันจินะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VII
สารบัญรูป		IX
บทที่ 1	**บทนำ**	1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	**ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
2.1	บิวทานอล (Butanol)	5
	2.1.1 ประวัติของบิวทานอล	5
	2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล	6
	2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล	6
	2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล	8
2.2	กระบวนการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล	9
	2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก	9
	2.2.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก	11
	2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก	12
2.3	กลูโคส (Glucose)	15
	2.3.1 แหล่งที่มา	16
	2.3.2 คุณสมบัติของกลูโคส	17
	2.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
2.4	กลีเซอรอล (Glycerol)	19
	2.4.1 ประวัติของกลีเซอรอล	20
	2.4.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล	21
	2.4.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	21
	2.4.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล	21
	2.4.5 การหมักกลีเซอรอล	24
	2.4.6 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล	25
2.5	สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	25
2.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล	28
บทที่ 3	**วิธีการดำเนินงานวิจัย**	33
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	33
3.2	สารเคมี	33
3.3	อุปกรณ์	33
3.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ	34
	3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial	34
	3.4.2 อาหาร P2 ที่เติมกลูโคส	35
	3.4.3 อาหาร P2 ที่เติมกลีเซอรอล	36
3.5	การเพาะเลี้ยงเชื้อ	37
	3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	37
	3.5.2 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	37
3.6	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสกับกลีเซอรอล	38
3.7	การวิเคราะห์ตัวอย่าง	38
	3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	38
	3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	39
	3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ	39
	3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผล**	40
4.1	ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม	40
4.2	การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส	42
4.2.1	ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	42
4.2.2	ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	44
4.3	ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390	47
4.3.1	ผลการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อ*C.Beijerinckii* ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	47
4.3.2	ผลการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อ *C. beijerinckii* ในอาหารชุดควบคุม (กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับอาหารกลีเซอรอล (20 กรัมต่อลิตร)	51
บทที่ 5	**สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ**	56
เอกสารอ้างอิง		57
ภาคผนวก ก	กราฟมาตรฐานของสารต่างๆ	62
ภาคผนวก ข	การวิเคราะห์ทางสถิติ	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล	7
2.2	ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล	7
2.3	คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส	17
2.4	คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	22
2.5	ชื่อเรียกและสูตรเคมีของกลีเซอรอล	23
4.1	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	41
4.2	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	43
4.3	ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ	45
4.4	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	48
4.5	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์*Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	51
4.6	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	53
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	66
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	68
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	71
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.5	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	77
ข.6	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	79
ข.7	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	81
ข.8	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium berjerinckii*	3
2.1	โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	5
2.2	การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก	9
2.3	ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า	10
2.4	ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่น เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า	10
2.5	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum*	13
2.6	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส	18
2.7	โครงสร้างทางเคมีของกลีเซอรอล	19
2.8	สมการปฏิกิริยาแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด	20
2.9	ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน	24
2.10	ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล	26
2.11	ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนสั้น	27
4.1	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (—◆—) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (—■—) ในอาหารอุดม P2	42
4.2	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C.beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (·····◆·····) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ*C .beijerinckii* TISTR 1390 (·····■·····) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	44
4.3	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (- -◆- -)และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C . beijerinckii* TISTR 1390 (·····■·····) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—✕—) อะซีโตน (—+—) 1,3โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	49
4.5	วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลเท่านั้น ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม	50
4.6	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (┈✕┈) อะซีโตน (┈+┈) 1,3โพรเพนไดออล (┈●┈) และค่าความเป็นกรดด่าง (┈▲┈) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	52
4.7	ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (╌✕╌) 1,3โพรเพนไดออล (╌+╌) และค่าความเป็นกรดด่าง (╌▲╌) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	54
ก.1	กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	62
ก.2	กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	62
ก.3	กราฟมาตรฐานของอะซีโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	63
ก.4	กราฟมาตรฐานของ1,3-โพรเพนไดออลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	63
ก.5	กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	64
ก.6	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ บิวทานอลมาตรฐาน	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

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

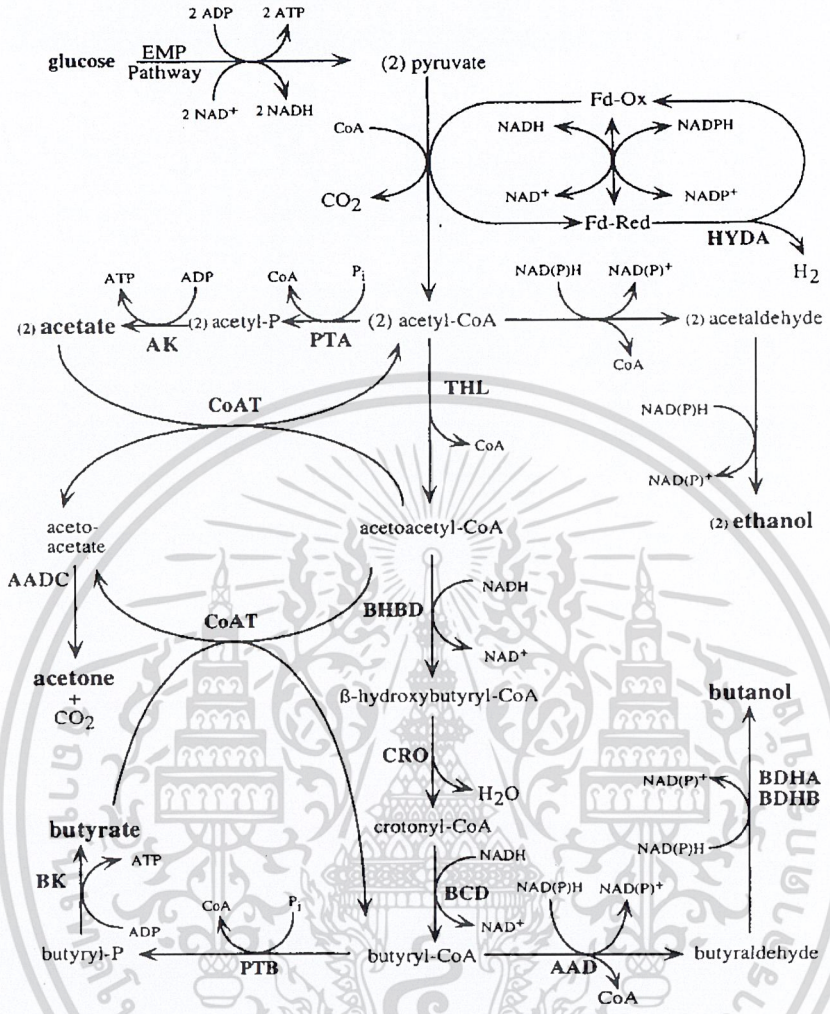
บิวทานอล หรือ บิวทิวแอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งจะมีโครงสร้างเป็นคาร์บอน 4 อะตอม และมีสูตรโมเลกุลเป็น C_4H_9OH เป็นสารที่มีขั้วอ่อนๆจึงมักใช้เป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด จุดหลอมเหลวต่ำ สามารถติดไฟได้ง่าย ทำให้เกิดการนำเอาบิวทานอลมาใช้เป็นผลิตเชื้อเพลิง บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์กระบวนการหมักอะซีโตน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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตบิวทานอลนั้นเกิดจากการนำเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการผลิต โดยในการทำงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium berjerinckii* ในการผลิตบิวทานอล ซึ่งเชื้อนี้จะสามารถหมักแป้งและน้ำตาลได้บิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วงตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นแรกช่วงนี้ว่า Acidogenesis phase ซึ่งจะทำการผลิตกรดจำพวกกรด อะซีติก และกรดบิวทาริค และช่วงที่สองจะเป็นการเปลี่ยนสารละลายในกระบวนการผลิตให้เป็นผลิตภัณฑ์ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (อัตราส่วนของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะเป็น 3:6:1) (Ruchir และคณะ, 1999) วิถีการสร้าง อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จะเกิดขึ้นดังรูปที่ 1.1 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักของ *Clostridium berjerinckii* นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก และได้เอทานอลและอะซีโตนเป็นผลพลอยได้ในกระบวนการหมัก

ในการศึกษานี้ต้องการทราบว่าเชื้อ *Clostridium berjerinckii* นั้นสามารถเจริญเติบโตและผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้โดยการเติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับการเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงทำการมุ่งเน้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium berjerinckii* TISTR 1390 โดยใช้กลีเซอรอลเพื่อการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

1.2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับการเจริญเติบโตจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับเตรท

1.2.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลของเชื้อจุลินทรีย์จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสับเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3. ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ซึ่งได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยใช้กลูโคสและกลีเซอรอลทั่วไปในห้องปฏิบัติการเป็นแหล่งอาหาร จากนั้นหากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ จึงทำการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิต บิวทานอลของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบถึงแนวทางการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ และพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.4.2 ทราบถึงช่วงเวลาและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* และให้มีการผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด

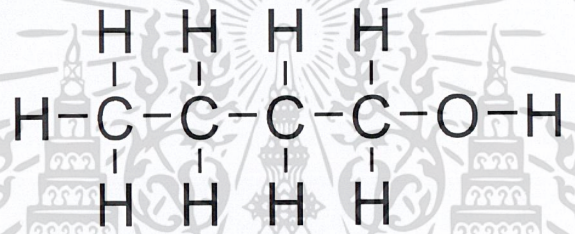
1.4.3 ทราบว่าเชื้อ *Clostridium beijerinckii* สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล (Butanol)

บิวทานอลหรือบิวทานอลแอลกอฮอล์ เป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่ประกอบด้วยสายคาร์บอน 4 ตัวและหมู่ไฮดรอกซิล (OH-) ที่มีโครงสร้างโมเลกุล C_4H_9OH ตามแบบในรูป 2.1 ซึ่งเป็นสารมีขั้วอ่อนๆ ซึ่งมักเป็นตัวทำละลาย มีจุดเดือด มีจุดหลอมเหลวต่ำ ในสภาวะปกติจะอยู่ในสภาวะของเหลวและระเหยได้ง่าย สามารถติดไฟได้ง่าย จึงสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้



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

2.1.1 ประวัติของบิวทานอล

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

ในปัจจุบันบิวทานอลถูกใช้งานในลักษณะของตัวทำละลายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมเคมี อีกทั้งใช้เป็นสารตั้งต้นของทินเนอร์ อีกทั้งยังใช้บิวทานอลในการเป็นตัวทำละลายที่ต้องการระเหยช้า เนื่องจากบิวทานอลมีจุดเดือด จุดหลอมเหลวที่สูงกว่าเมทานอลและเอทานอล

นอกจากนี้บิวทานอลยังใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำหอม และในปัจจุบันนี้บิวทานอลมีแนวโน้มว่าจะถูกใช้เป็นเชื้อเพลิงมากขึ้น ซึ่งบิวทานอลสามารถใช้เชื้อเพลิงได้โดยตรง โดยไม่เป็นอันตรายต่อเครื่องยนต์ที่ปริมาณบิวทานอลความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในความเข้มข้นสูงปริมาณนี้ของเอทานอลนั้นไม่สามารถใส่ในเครื่องยนต์ได้โดยไม่ดัดแปลงเครื่องยนต์ บิวทานอลมีความร้อนมากกว่าเอทานอลและมีความร้อนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน

2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล

2.1.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

บิวทานอลมีคุณสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงตามตารางที่ 2.1

2.1.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

บิวทานอลมีชื่อเรียกทั่วไปและทางเคมี ดังแสดงตามตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

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

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

ตารางที่ 2.2 ชื่อเรียกและสูตร โมเลกุลของบิวทานอล

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

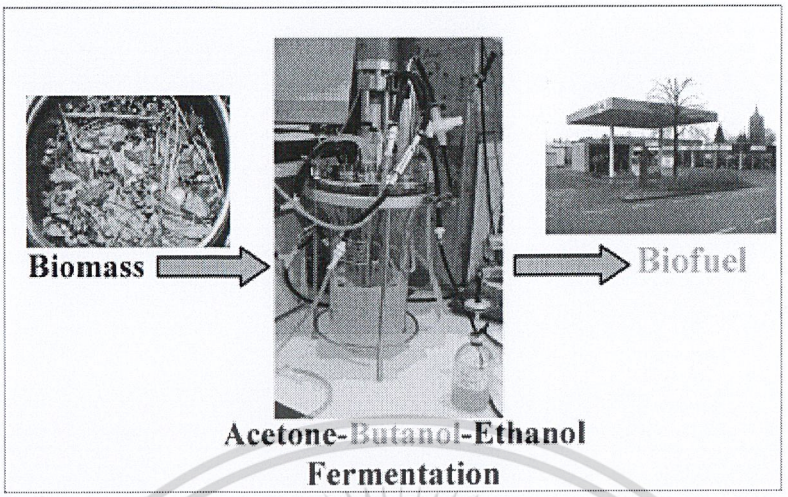
ที่มา: http://www.apcbkk.com/file/thai/Alcohol%20Group/n-Butanol%20(NBA).pdf (01/04/2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล

บิวทานอลสามารถได้มาจากหลายวิธีคือกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน กระบวนการหมักจากมวลชีวภาพบางชนิด และ กระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมาคือ กระบวนการหมัก โดยใช้แบคทีเรียที่เหมาะสม ซึ่งในการหมัก มักจะเรียกว่ากระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation)โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในจีนัส *clostridium* เช่น *Clostridium butyricum* และ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งเดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อผลิตอะซีโตน จากสารจำพวกแป้ง ซึ่งตอนนั้นบิวทานอลและเอทานอลเป็นผลพลอยได้ที่ได้ออกมาจากการหมัก ซึ่งบิวทานอลที่ได้นั้นมากพอสมควร และในปัจจุบัน กระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล มีกระบวนการดังนี้คือ เมื่อสารตั้งต้น เช่น น้ำตาล ถูกหมักรวมกับยีสต์แล้วได้ผลผลิตเป็นเอทานอล ต่อมาแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium* นั้นจะเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นบิวทานอล ซึ่งในกระบวนการนี้ ยีสต์ที่นำมาหมักนั้นจะตายไปเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 14-16 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ที่เปลี่ยนเอทานอลให้เป็นบิวทานอลจะตายไป เมื่อความเข้มข้นของบิวทานอลประมาณ7 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความพยายามที่จะค้นคว้าให้ แบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ซึ่งใช้ในการหมักสามารถทนทานต่อบิวทานอลให้ได้มากขึ้น เพื่อให้ผลผลิตของบิวทานอลมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากการศึกษาพบว่าบิวทานอลให้พลังงานได้สูงกว่าเอทานอลตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้พวกของเหลือจากการผลิตเอทานอลยังสามารถนำมาผลิตบิวทานอลต่อได้อีกด้วย (โครงการจัดทำระบบฐานข้อมูลพลังงานเพื่อการวิเคราะห์และวางแผนยุทธศาสตร์พลังงานของประเทศ สถานบันวิจัยและพัฒนาพลังงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

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

2.2 กระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

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

แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิลิตร เป็นพวกแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (obligate anaerobes) หรือมีบางพวกเป็นแบคทีเรียที่ใช้อากาศ (aerotolerant) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว มีความสามารถในสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น การขาดสารอาหาร เป็นต้น สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์มีความทนทานต่อความร้อน ความแห้ง และสารเคมีได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cell) สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียสได้นานถึง 10-15 นาที เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมทาบอลิซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงัก จนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ (จริยา, 2541)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

รูปที่ 2.4 ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า

ที่มา : Spivey (1978)

การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด (blood agar) และ อาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง (egg yolk agar) ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจากอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือด สามารถนำมาตรวจดู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดง สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์เลซิทิเนส (lecithinase) โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากความเป็นเงา (iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

การแยกเชื้อ *Clostridium* ออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ (Primary isolation) ทำได้โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียสนาน 10-15 นาที เพื่อทำลายเซลล์ปกติ และบ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเลี้ยงต่อ (subculture) ในอาหาร หรือนำตัวอย่าง ใส่ในอาหาร thioglycolate broth ที่มีกลูโคส บ่มไว้ 24-48 ชั่วโมง เชื้อ *Clostridium* จะเปลี่ยนกลูโคสได้เป็นกรดที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้

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

2.2.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก

ลักษณะของการเกิดผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมักอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ช่วงแรกแบคทีเรียจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดขึ้นเรียกช่วงนี้ว่า อะซิโดจีนิซิสเฟส (Acidogenesis phase) โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอ (acetyl CoA) และอะซีติลโคเอ จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซีติก (acetic acid) และบิวไทริลโคเอ (butyryl CoA) ก่อนเปลี่ยนเป็นกรดบิวทิริก (butyric acid) ในช่วงนี้ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง จากนั้นแบคทีเรียจะเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวทำละลายต่างๆ โดยกรดอะซีติกจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีโตน ส่วนกรดบิวทิริกจะถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอลและอะซิติลโค-เอเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (acetyldehyde) ซึ่งอะซิทัลดีไฮด์จะเปลี่ยนเป็นเอทานอล เรียกช่วงนี้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซลเวนโทจีนิซิสเฟส (Solventogenesis phase) ในขั้นตอนนี้จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นและจะมีการนำกรดอินทรีย์มาใช้เป็นบางส่วน ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างที่ อะซิโดจีนิซิสเฟสเปลี่ยนเป็นโซลเวนโทจีนิซิสเฟส เรียกว่า จุดเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่าง (pH transition point) หรือ จุดยุติค่าความเป็นกรดด่าง (pH break – point) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีพิษต่อเซลล์น้อยกว่ากรดอินทรีย์ นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีแก๊สไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นด้วย วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล แสดงดังรูป 2.5

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

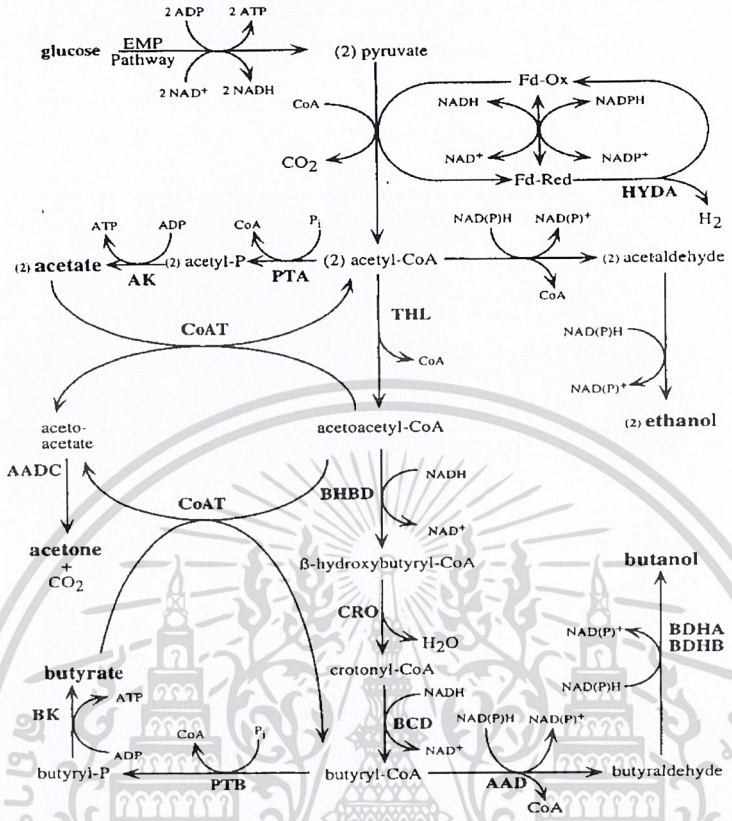
เพื่อให้มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดและได้ปริมาณบิวทานอลสูง จำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นปัจจัยสำคัญและองค์ประกอบด้านสภาพแวดล้อมอื่นๆ

2.2.3.1 สารตั้งต้น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส (phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต- บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-COA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส (butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)

ที่มา: Ruchir และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ในการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล มีรายงานว่า การกำจัดปริมาณคาร์บอนเป็นอันตรายต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้การจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดในขั้นตอนสุดท้ายที่เกิดขึ้นจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้

2.2.3.3 อุณหภูมิ

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

2.2.3.4 ออกซิเจน

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

2.2.3.5 ระดับความเป็นกรดด่าง (pH)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.6 วิตามิน

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

2.2.3.7 Clostridial degeneration

กลไกการเกิดความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์บ่งชี้ได้จาก (1) การสร้างกรดที่มากเกินพอระหว่างการเจริญในช่วง การเติบโตแบบทวีการ(exponential phase) ซึ่ง Eva และคณะ (1995) ได้รายงานว่า *C. beijerinckii* NCIMV 8052 มีการใช้กลูโคสในการหมักซึ่งจะได้กรดอะซีติกและกรดบิวทาริก ในอัตราที่มากกว่าการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ความเป็นกรดด่างลดลงและเซลล์ไม่สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในช่วงของการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis phase) ได้และมีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น (2) Hugh และ Chen ในปี 1995 ได้คัดแยกสายพันธุ์กลายของ *C. beijerinckii* NCIMV 8052 ซึ่งมีความทนทานต่อความสูญเสียความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (3) มีการคาดคะเนว่าขีนควบคุมของ *C. beijerinckii* ที่มีการสูญเสียสภาพแล้วไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ในการเพาะเลี้ยงแบบ คีโมสแตท(chemostat) และ (4) เซลล์ที่เสียสภาพจะแบ่งตัวอย่างต่อเนื่องในการหมักแบบต่อเนื่องขณะที่เซลล์ที่ไม่เสียสภาพจะหยุดแบ่งตัวแล้วเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอนโดสปอร์

2.3 กลูโคส (Glucose)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 แหล่งที่มา

จากธรรมชาติ

1. ในพืชและสิ่งมีชีวิตจำพวกโพรแคริโอต จากการสังเคราะห์แสง

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

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

ผลิตทางการค้า

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

กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ช่วยจะมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

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

2. ขั้นตอนที่สองเรียกว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะไฮโดรไลซ์แป้งบางส่วนและไฮโดรไลซ์กลูโคสอย่างสมบูรณ์โดยใช้เอนไซม์ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) จากเชื้อรา *Aspergillus niger* สภาวะของปฏิกิริยาจะต้องควบคุมให้อยู่ที่ pH 4.0-4.5 อุณหภูมิ 60 °C และความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจะต้องอยู่ที่ 30-35% โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวการณ์เหล่านี้แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสประมาณ 96% หลังจากใช้เวลา 1-4 วัน ถ้าจะให้ผลผลิตสูงกว่านี้สามารถทำได้โดยการทำให้สารละลายจางลง แต่จะต้องใช้หม้อต้มที่ใหญ่กว่าและต้องการน้ำมากกว่าซึ่งสรุปแล้วไม่ประหยัดกว่า สารละลายกลูโคสที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการกรอง และเคี่ยวให้งวดในเครื่องระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เอนกประสงค์ (multiple-effect evaporator) ดี-กลูโคสที่เป็นของแข็งจะทำได้โดย การตกผลึก (crystallization)

2.3.2 คุณสมบัติของกลูโคส

กลูโคสมีชื่อเรียกทางเคมีและคุณสมบัติตามตารางที่ 2.3 และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูป 2.6

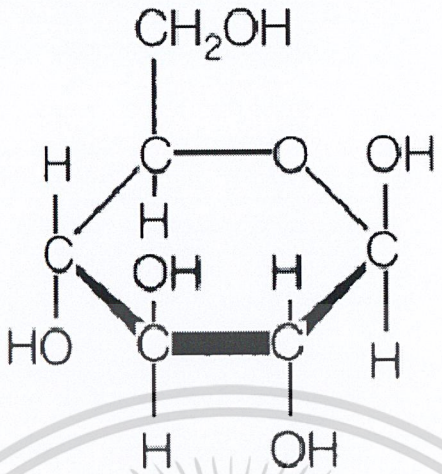
ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

117165



รูปที่2.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส

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

2.3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล

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

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

Pimpa และ Goma (1984) กล่าวว่า ในวิถีเมตาบอลิซึมของการสร้างบิวทานอลจากกลูโคสโดยไม่ผ่านกรดบิวทิริคนั้น จะวิเคราะห์ได้ว่า ในบางครั้ง *Clostridium* สามารถสร้างบิวทานอลจากกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้โดยตรง โดยไม่ผ่านกรดบิวทิริค ซึ่งมีข้อเสียคือ นอกจากไม่มีการกำจัดกรดอะซีติกแล้ว ยังต้องใช้ $NADH+H^+$ มากขึ้นอีกด้วย

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

2.4 กลีเซอรอล (Glycerol)

กลีเซอรอล เป็นสารประกอบอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีสมบัติเป็นกรดที่อ่อนมากๆ สูตรเคมีคือ $C_3H_8O_3$ เป็นของเหลวข้น ไม่มีสี มีจุดเดือด 290°C ละลายน้ำได้ เป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันหรือน้ำมัน เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอริน ซึ่งได้จากไฮโดรไลต์ (เอาน้ำเข้าไปทำปฏิกิริยา) น้ำมันจากพืชหรือ ไขมันจากสัตว์ โดยมีกรดหรือเบสเจือจางเป็นตัวเร่ง พร้อมทั้งได้กรดไขมัน ในปฏิกิริยานี้ถ้าใช้เบสแก่เข้าไปทำปฏิกิริยาเพิ่ม ก็จะได้เกลือของกรดไขมันเรียกว่าสบู่ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า สปอนนิฟิเคชัน ซึ่งมีประโยชน์มากมาย ทั้งใช้ในอุตสาหกรรมทำยา เครื่องสำอาง สบู่ เป็นต้น

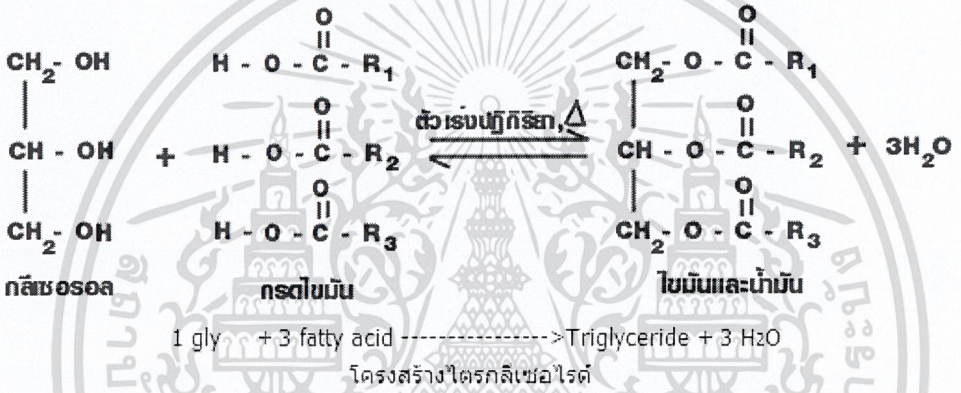
รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของกลีเซอรอล

ที่มา: http://biology.clc.uc.edu/courses/bio104/lipids.htm (22/03/2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 ประวัติของกลีเซอรอล

ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1799 โดย Carl W. Scheele จากปฏิกิริยาสปอนนิฟิเคชัน (sponification) ของน้ำมันมะกอก มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและมีรสหวาน ต่อมาพบว่ากลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบหลักในไขมันและน้ำมันเกือบ ทุกชนิดโดยไขมันและน้ำมันประกอบด้วยกลีเซอรอลที่มีหมู่เอสเทอร์มาเกาะกัน 3 หมู่ หรือที่เรียกว่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เมื่อนำไขมันหรือน้ำมันมาแยกสลายด้วยน้ำในสภาวะกรดจะได้กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) ดังแสดงในรูป 2.8



รูปที่ 2.8 สมการปฏิกิริยาแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด
ที่มา : http://learners.in.th/blog/biochem/171449 (22/03/2554)

ในช่วงแรก ได้นำกลีเซอรอลไปใช้ในการผลิตกาว ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้กาวมีความเหนียวมากขึ้น ในเวลาต่อมาได้นำไปใช้ในการทำสีย้อมน้ำหมึกและอื่นๆ จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1867 นักเคมีชาวสวีเดนชื่อ Alfred Nobel ได้คิดค้นวิธีการผลิตระเบิดไดนาไมต์ (dynamite) โดยใช้กลีเซอรอลที่ทำอยู่ในรูปไนโตรกลีเซอรีน (nitroglycerine) เมื่อนำมาผสมกับซิลิกา (silica) ณ จุดนี้ถือเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการนำกลีเซอรอลไปประยุกต์ในอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล

กลีเซอรอล หรือ 1,2,3-propanetriol เป็นแอลกอฮอล์อย่างง่าย (simple alcohol) ชนิดหนึ่งซึ่งมีการใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สี เครื่องจักร เครื่องยนต์ อาหาร ยาสูบ เภสัชกรรม ผสมในอาหารสัตว์ ใช้ใน การผลิต Propylene glycol และ Ethylene glycol และใช้ปรับสภาพดินเพื่อช่วยในการเพาะปลูกพืช เป็นต้น นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังถูกใช้เป็นสารตั้งต้น (feedstock) สำหรับการผลิตสารเคมีต่างๆ เช่น ใช้ในการผลิต 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-propanediol) แก๊สไฮโดรเจน เอทานอล กรดบิวไทริก กรดโพไพโอนิก และกรดอะซิติก เป็นต้น

(http://www.neutron.rmutphysics.com/scienceglossary/index.php?option=com_content&task=view&id=12495&Itemid=5, 01/04/2554)

2.4.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล

2.4.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีคุณสมบัติทางกายภาพตามตารางที่ 2.4

2.4.3.2 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลมีชื่อเรียกทั่วไปและทางเคมีตามตารางที่ 2.5

2.4.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by-product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล หรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

กลีเซอรอลถูกผลิตได้จากกระบวนการหลากหลายทั้งทางเคมี ทางชีวภาพ โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลหรือปฏิกิริยาการเกิดสบู่ ในงานวิจัยนี้จะให้ความสำคัญกับกลีเซอรอลที่เป็นผลพลอยได้มาจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งมีแนวโน้มที่จะให้ปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ตามกำลังการผลิตไบโอดีเซลที่เพิ่มมากขึ้น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ชื่อเรียกและสูตรเคมีของกลีเซอรอล

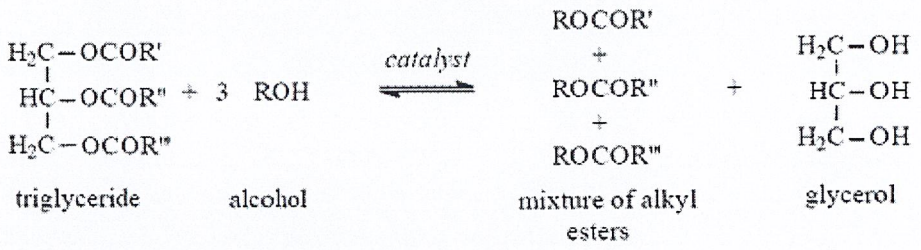
ชื่อ IUPAC	1,2,3-Propanetriol หรือ 1,2,3-Trihydroxypropane
ชื่อทั่วไป	Glycerol ; Glycerin
ชื่อพ้องอื่นๆ	D-glycerol, L-glycerol, Glyceritol, Glycyl alcohol, Trihydroxypropane, Glycerin mist, Polyhydric alcohols, Propanetriol
สูตรโมเลกุล	$C_3H_5(OH)_3$

ที่มา : http://msds.pcd.go.th/searchName.asp?vID=1568 (25/05/2554)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลให้กลีเซอรอลดิบประมาณ 10% โดยน้ำหนักของไบโอดีเซลที่ผลิตได้ ซึ่งกลีเซอรอลดิบที่ได้เป็นสีน้ำตาล เนื่องจากมีสิ่งเจือปนที่เป็นสารอินทรีย์ปนอยู่ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่สูญเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ถ้าสารอินทรีย์เหล่านี้ถูกนำกลับไปเพื่อเปลี่ยนเป็นไบโอดีเซลได้ จะทำให้ผลได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลสูงขึ้น นอกจากนี้มีรายงานว่ากลีเซอรอลมีศักยภาพในการผลิตเป็นเชื้อเพลิงจึงได้ทำ การศึกษากระบวนการแปรรูปกลีเซอรอลดิบให้เป็นแก๊สไฮโดรเจนด้วยการใช้กระบวนการทางชีวภาพคือ กระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อหมักกลีเซอรอลดิบในสภาวะไร้อากาศ

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน (tranesterification) เป็นปฏิกิริยาระหว่างไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ของไขมันสัตว์หรือน้ำมันพืชกับแอลกอฮอล์ โดยมีเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ เมทิลเอสเตอร์ (ไบโอดีเซล) และกลีเซอรอล ซึ่งปริมาณของกลีเซอรอลจะมีประมาณ 10% ของไบโอดีเซลที่เกิดขึ้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงได้ ดังรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2.9 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชัน

ที่มา : http://www.manasu.safety-stou.com/page/6/ (25/05/2554)

ในการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันมักจะต้องการตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ และเนื่องจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเตอริฟิเคชันสามารถดำเนินการแบบย้อนกลับได้ การใช้แอลกอฮอล์มากเกินพอจะช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดไปทางการผลิตไบโอดีเซลมากขึ้น ส่วนกระบวนการเกิดปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชันแบบย้อนกลับเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันอิสระ (FFA) กับเมทานอล (CH_3OH) โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและจะได้ผลิตภัณฑ์คือเมทิลเอสเตอร์ (ไบโอดีเซล) และกรดไขมันอิสระ (FFA) ดังสมการ

2.4.5 การหมักกลีเซอรอล

ในการหมักกลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลและผลผลิตที่ได้คือแก๊สไฮโดรเจนและเอทานอลโดยความเข้มข้นของกลีเซอรอล สิ่งเจือปน และอาหารเสริมสำหรับจุลินทรีย์ส่งผลต่ออัตราการผลิตผลผลิตดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ *Enterobacter aerogenes* HU-101 *Petrotoga miotherma Thermosipho africanus Thermotoga elfii Fervidobacterium pennavorans Thermotoga neapolitana* และ *Clostridium butyricum* เป็นต้น ผลผลิตที่ได้โดยทั่วไปได้แก่ แก๊สไฮโดรเจน เอทานอล 1,3-โพรเพนไดออล กรดบิวไทริก กรดโพรไพโอนิก และกรดอะซิติกเป็นต้นโดยความเข้มข้นของกลีเซอรอล สิ่งเจือปน และอาหารเสริมสำหรับจุลินทรีย์ ส่งผลต่ออัตราการผลิตผลผลิตดังกล่าว โดย pH ที่เหมาะสมในการการผลิตแก๊สไฮโดรเจนด้วยจุลินทรีย์อยู่ในช่วง pH 6.0-7.5 (พงศธรและอมาวสี, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล

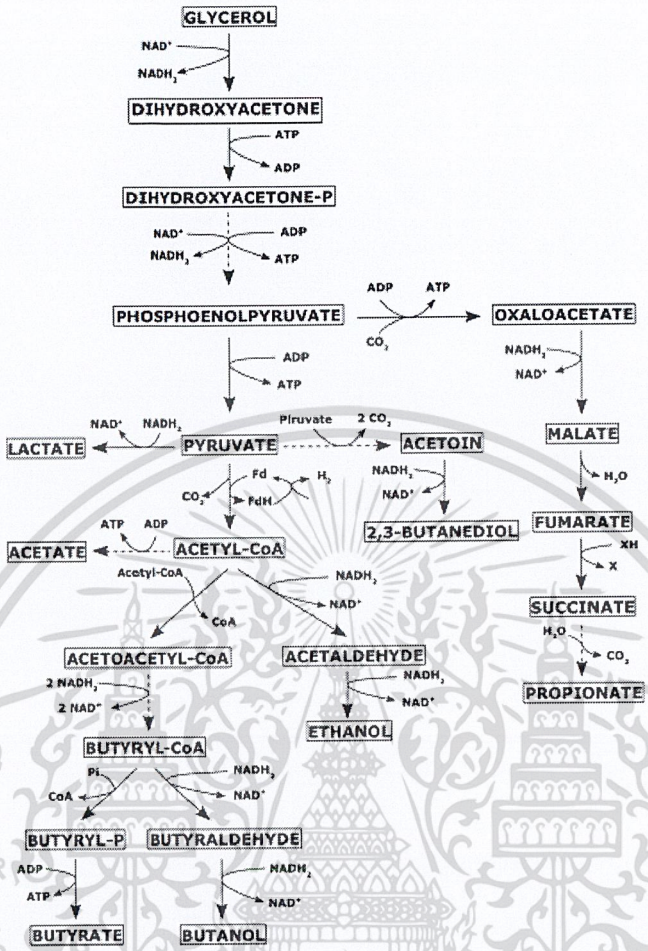
การหมักจากกลีเซอรอลไปเป็นเอทานอลหรือบิวทานอลโดย *C.pasteurinum* ไม่ขึ้นอยู่กับการสร้างเป็นผลพลอยได้ (by-product) จนกระทั่งตัวพาไฮโดรเจนจะสมบูรณ์เมื่อถูกสร้างขึ้นใหม่ในวิถี อีกตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการredox-balancedเป็นการเปลี่ยนแปลงกลีเซอรอลไปเป็น succinic acid แม้ว่าวิถีสำหรับเอทานอลและ saccinate มีค่าเท่ากับ redox-balanced ที่เกี่ยวโยงกันทั้งหมด ซึ่งมีการใช้พลังงานของวิถี ethanologenic สูงมาก คือ 1ATP เป็นผลผลิตต่อแต่ละโมเลกุลของกลีเซอรอล ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล ขณะที่การผลิตพลังงานในวิถีsaccinate จะถูกจำกัดไปเป็นความสามารถในการสร้าง proton motive force โดย fumarate reductase (Dharmadi และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.10

2.5 สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Bacteria
Division	:	Firmicutes
Class	:	Clostridia
Order	:	Clostridiale
Family	:	Clostridiaceae
Genus	:	*Clostridium*
Species	:	*Clostridium beijerinckii*

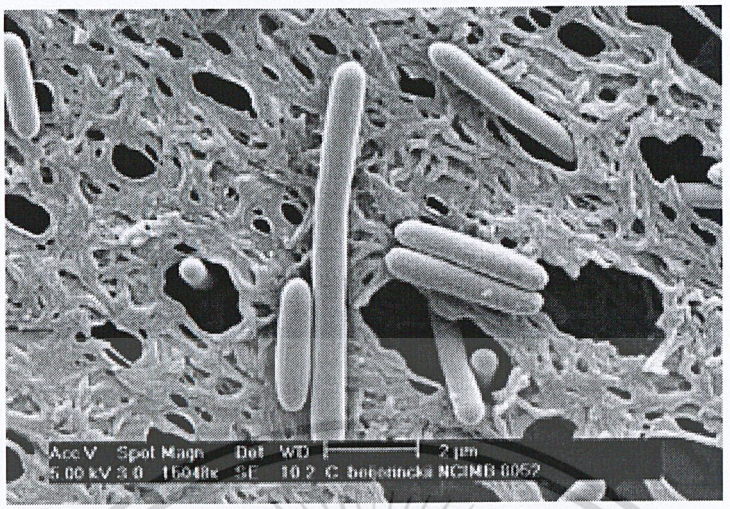
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2.10 ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย กลีเซอรอล

ที่มา: da Silva และคณะ, 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนสั้น

ที่มา : http://genome.jgi-psf.org/clobe/clobe.home.html (11/03/2554)

Clostridium beijerinckii เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนสั้น ดังแสดงในรูปที่ 2.11 สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำการแยกได้จากอุจจาระและในดิน จะมีการสร้างสปอร์เป็นรูปท่อนปล้องมีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ในระดับอุตสาหกรรมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น บิวทานอล อะซีโตน และไอโซโพรพานอล ณ สภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 °C จะมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีความหลากหลาย(ไม่จำกัดจำนวน) ซึ่งรวมถึง เพนโตส เฮกโซส และแป้ง ข้อดีของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ มีความสามารถในการเติบโตที่ง่าย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพงในการเพาะเลี้ยง มีความเสถียรของสายพันธุ์ที่ทนต่อการเสื่อมสภาพ มีการปรับตัวดีในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง และตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในระยะ Log phase เป็นต้น *Clostridium beijerinckii* สามารถหมักแป้งได้เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่ และ ได้อะซีโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อย นอกจากนี้ *Clostridium beijerinckii* บางสายพันธุ์จะผลิตไอโซโพรพานอลออกมาด้วยนอกเหนือจากอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล

นักวิจัยหลายท่านได้มีการศึกษาการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตนี้สามารถกำหนดสภาวะให้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการได้ รวมทั้งยังศึกษาความเป็นไปได้ที่จะมีประยุกต์ใช้เศษวัตถุดิบเหลือใช้มาประยุกต์ใช้เพื่อทำการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่างๆ เพื่อเป็นการลดต้นทุนด้านวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต โดยทดแทนสารตั้งต้นสังเคราะห์สำเร็จรูปที่มีราคาแพง รวมไปถึงช่วยลดปัญหามลภาวะที่มาจากเศษวัตถุดิบเหลือใช้จากทางการเกษตร

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

Qureshi และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตบิวทานอล จากกระบวนการย่อยฟางข้าวสาลี โดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ด้วยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวสาลีให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆกันได้ผล 100% ในการเพิ่มฟางข้าวสาลีโดยการป้อนลงในถังหมักร่วมกับสารละลายน้ำตาล ทำให้อัตราผลผลิต (productivity) ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เพิ่มขึ้น 16% เมื่อเทียบกับการการทดลองการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและการหมักให้ได้บิวทานอลไปพร้อมๆ กัน ซึ่งได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.36 $gL^{-1}h^{-1}$ และ ณ เวลาเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ถูกกระตุ้นสูงสุดจะได้อัตราผลผลิต (productivity) 0.77 $gL^{-1}h^{-1}$ การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องใช้เวลาในทั้งสิ้น 533 ชั่วโมง

Qureshi และคณะ (2010) ศึกษากระบวนการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดและการย่อยหญ้า switchgrass โดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลของการทดลองจะได้ว่า การทดลองควบคุมจะใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ผลลัพธ์ในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลทั้งหมดเท่ากับ 21.06 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอล เอทานอลคือ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง กระบวนการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพดโดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะไม่แสดงการเจริญเติบโต และไม่เกิดการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเจือจางด้วยน้ำและเจือจางด้วยการหมักการย่อยฟางข้าวสาลี (อัตราส่วน 1:1) ผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลจะมีค่าความเข้มข้นเป็น 16.00 และ 18.04 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลลัพธ์ของอัตราผลผลิต (productivity) มีค่าระหว่าง 0.17-0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อทำการปรับสภาพด้วยการย่อยลำต้นหรือใบของข้าวโพด ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] (เรียกว่ากระบวนการ Overliming) จุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลได้ 26.67 กรัมต่อลิตร การย่อยหญ้า switchgrass โดยไม่ผ่านการปรับสภาพจะทำให้ผลของการหมักต่ำ และจุลินทรีย์ไม่สามารถผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลมากกว่า 1.48 กรัมต่อลิตร หรือมากเกิน 14.61 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า การปรับสภาพสารชีวมวลไม่สามารถที่จะหยุดการสร้างสารยับยั้งที่มาจากการทดลองได้ หรืออีกประการหนึ่งเชื้อจุลินทรีย์ทนต่อสารยับยั้งและสามารถผลิตบิวทานอลได้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งอาจใช้สำหรับเป็นแนวทางในการปรับปรุงกระบวนการหมักอื่นๆให้ดีขึ้น

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

ต่อมา ในปี ค.ศ. 2004 Tashiro และคณะ ศึกษาการผลิตบิวทานอลด้วยการหมักแบบกึ่งกะที่ควบคุมความเป็นกรดด่างให้คงที่ด้วยการเติมกรดบิวทิริค และกลูโคส จากการทดลองพบว่าการเติมกรดบิวทิริคลงไปในอาหาร สามารถเพิ่มอัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ การผลิตอะซีโตน บิวทานอล และผลได้ของตัวทำละลายด้วย *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ได้โดยกระบวนการเติมกรดบิวทิริคและกลูโคส สามารถควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารให้อยู่ในระดับต่ำได้อย่างสม่ำเสมอ และได้ผลได้ของบิวทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 1.5 เท่า นอกจากนี้ยังได้อัตราผลผลิตบิวทานอลจำเพาะ (specific butanol product rate) มากกว่า 0.10 กรัมต่อกรัมต่อลิตรที่เวลา 39 ชั่วโมงของการหมัก เมื่ออัตราการส่วนระหว่างกรดบิวทิริคและกลูโคสเท่ากับ 1.6 และพบว่าการเติมกรดบิวทิริค และการควบคุมความเป็นกรดด่างให้อยู่ในระดับต่ำ (น้อยกว่า 5.5) จะไม่พบการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเติมกรดอะซีติกลงไปในอาหารจะเพิ่มการผลิตอะซีโตนเท่านั้น

ในปี ค.ศ. 1982 Bahl และคณะรายงานว่าการเติมกรดอะซีติก และบิวทิริค ลงในการหมักแบบกึ่งกะที่ใช้ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ทำให้ผลได้ของตัวทำละลายเพิ่มขึ้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1984 Monot และคณะ ได้รายงานว่ากรดบิวทิริคที่ถูกเติมลงในอาหารหมัก เป็นตัวชักนำให้เกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตบิวทานอล โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 จากผลการทดลองยังพบว่า ความเป็นกรดด่างของอาหารมีผลต่อการผลิตกรดอินทรีย์ และตัวทำละลาย ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างสูง การหมักจะได้กรดอินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่การหมักในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างต่ำจะได้ตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งการผลิตตัวทำละลายโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *C. saccharoperbuty-lacetonicum* N1-4 จะเพิ่มขึ้นที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 ซึ่งให้ผลคล้ายการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลด้วย *Clostridium* ชนิดอื่น

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

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

ปี ค.ศ. 2005 Tashiro และคณะศึกษาการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงด้วยการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และการดึงเซลล์ออกจากการทดลองพบว่า การหมักอย่างต่อเนื่องที่ไม่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราการเจือจางวิกฤติ (critical dilution rate) เท่ากับ 0.26 ต่อชั่วโมง และให้อัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล รวมกันเท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.20 ต่อชั่วโมง สำหรับการหมักอย่างต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ มีอัตราผลผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 11.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.85 ต่อชั่วโมง ซึ่งการหมักในระบบนี้สามารถปรับปรุงอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรได้เมื่อหมักอย่างต่อเนื่องที่อัตราเจือจางสูง (มากกว่า 0.52 ต่อชั่วโมง) ในขณะที่การหมักอย่างต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และการดึงเซลล์ออกจากถังหมัก มีอัตราการผลิตอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเชิงปริมาตรสูงสุดเท่ากับ 7.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และหมักได้นานถึง 200 ชั่วโมง

ปี ค.ศ. 2010 Qureshi และคณะ การย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ผลในการผลิต คือได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เป็นปริมาณ 7.09 กรัมต่อลิตร ผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เท่ากับ 0.33 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ระดับ อะซีโตน บิวทานอล เอทานอลนี้จะมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการควบคุมการหมัก (21.06 กรัมต่อลิตร) เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้น ในการควบคุมการหมัก ผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลเท่ากับ 0.41 และอัตราผลผลิต (productivity) ได้เป็น 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเปรียบเทียบนี้จะชี้ให้เห็นว่าการย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางเป็นพิษต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อลดผลของความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นนี้ ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะได้รับการปรับสภาพด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH)_2$] ตามด้วยการหมัก การปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางจะทำให้การหมักประสบผลสำเร็จ และความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้เท่ากับ 26.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้ดีกว่าการควบคุมการหมักและการหมักฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางและไม่ผ่านการปรับสภาพ (ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร) ในการหมักผลได้ของอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล เท่ากับ 0.43 และได้อัตราผลผลิต (productivity) เป็น 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (390% ของการหมักที่ไม่ผ่านการปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง และการใช้ฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจางโดยไม่เจือจางน้ำตาล) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ปรับสภาพฟางข้าวบาร์เลย์ที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริคเจือจาง ทำให้ได้อัตราผลผลิตเฉพาะ (specific productivity) เท่ากับ 0.55 ต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับ 0.12 ต่อชั่วโมงของการควบคุมการหมักที่มีการควบคุมการกระตุ้นของคาร์บอนที่มากขึ้น ซึ่งมาจากผลิตภัณฑ์การหมักโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

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

3.2 สารเคมี

กลูโคส
กรดแลคติก
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
เฟอริกซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)
3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)
แอมโมเนียมอะซิเตต
วุ้น (Agar)
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไดเดรต ($MnSO_4H_2O$)
กลีเซอรอล
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก
ไบโอติน (Biotin)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
ไทเอมีน (Thiamine)
สารสกัดจากยีสต์(Yeast extract)
อาหาร reinforced clostridial

3.3 อุปกรณ์

ฟลาก์ส
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
หลอดทดลอง
แท่งแก้วคน
ตะเกียงแอลกอฮอล์
หลอดหยด
จุกยางดูดสาร
บีกเกอร์
ขวด Duran
Anaerobic jar
กระบอกตวง
หลอดทดลองฝาเกลียว
ปิเปต
จุกสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุกยางปิดฟลาก์ส	หลอดปั้นเหวี่ยง
ขวดเก็บตัวอย่าง	ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
เครื่องปั่นเหวี่ยง	เข็มฉีดยา
แผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร	คิวเวต
ขวดน้ำกลั่น	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เคซีอีน เอนไซมาติค ไฮโดรไลเซต (Casein enzymatic hydrolysate)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารละลายเด็กซ์โตส (Dextrose)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม อะซีเตต (Sodium acetate)	3	กรัม
สารละลายแป้ง (Starch soluble)	1	กรัม
แอล-ซิสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ (L-Cysteine hydrochloride)	0.5	กรัม
วุ้น (Agar)	0.5	กรัม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 อาหาร P2 ที่เติมกลูโคส (Qureshi และ Blaschek, 1999)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

อะซีเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Minerals solution)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม

ชั่งสารสกัดยีสต์ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.4.3 อาหาร P2 ที่เติมกลีเซอรอล

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

อะซีเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Minerals solution)

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

ชั่งส่วนประกอบต่างๆละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร

กลีเซอรอล (Glycerol)	20	กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งกลีเซอรอล และสารสกัดยีสต์ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

จากนั้นนำส่วนผสมทั้งสี่สารละลายมารวมกันให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร จึงนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ในการทดลอง

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น *Clostridium beijerinckii*

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

3.5.2 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทความเข้มข้น 20 และ60 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอล เป็นสับสเตรทเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายวิตามินและสารละลายเกลือแร่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตรเรียบร้อยแล้ว แบ่งใส่ฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 24 ฟลาก์สๆ ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้จากหัวข้อ 3.5.1 ลงในแต่ละฟลาก์สๆ ละ 5 มิลลิลิตร ต่อมาทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในฟลาก์สเพื่อไล่ออกซิเจน ปิดปากฟลาก์สด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารที่มีกลูโคสกับกลีเซอรอล

เก็บตัวอย่างในแต่ละฟลาก์ส ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตรทุก 24 ชั่วโมง จนถึง 168 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 ฟลาก์ส ซึ่งตัวอย่างที่เก็บได้จะแบ่งนำไปวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตด้วยการเจือจางแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ตัวอย่างที่เหลือนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการแยกส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS หาปริมาณกลีเซอรอล อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* ที่ยังมีชีวิตอยู่ จะเริ่มจากการเจือจางตัวอย่างเป็นชุด (series dilution) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) ซึ่งมีรายละเอียดวิธีทำดังต่อไปนี้

ทำการหลอมอาหารเพาะเชื้อให้ละลายแล้วทิ้งให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมตัวอย่างให้เจือจางได้ความเข้มข้นช่วงที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง แล้วใช้ปิเปตต์ดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 จาน โดยเรียงจานทั้ง 3 ซ้อนกัน ดูดอาหารใส่จานล่างสุดก่อน แล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุดเช่นเดียวกัน เขย่าจานที่ซ้อนอยู่ทั้ง 3 ใบพร้อมกันโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานเป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bergmeyer และ Grassel, 1983)

นำส่วนใสของตัวอย่างช่วงเวลาละ 3 ซ้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้ ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรเติม DNS 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำก๊อกและเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ แบลงค์ (blank) เป็นน้ำกลั่นแทนน้ำตาลกลูโคส จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมสารละลายมาตรมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงในรูปที่ 5 ภาคผนวก ก

3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ

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

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อที่นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร และค่าเฉลี่ยของกลูโคสกับกลีเซอรอลที่ถูกใช้ไปในช่วงเวลาต่างๆ รวมทั้งค่าของบิวทานอลและอะซีโตนที่เชื้อสามารถผลิตได้ในช่วงเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์แบบ duncan เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม

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

จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.1 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 เริ่มต้นนับได้ 1.96×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 8.38×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น เมื่อเวลาผ่านไปจนจบการเพาะเลี้ยงที่ 168 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงเรื่อยๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท (น้ำตาลกลูโคส) โดยค่าความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 37.09 กรัมต่อลิตร คำนวณเป็นค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ไป 23.69 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144และ 168 ชั่วโมง มีการใช้น้ำตาลเพียงเล็กน้อยและเหลือความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ 20.30 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมต่อลิต โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

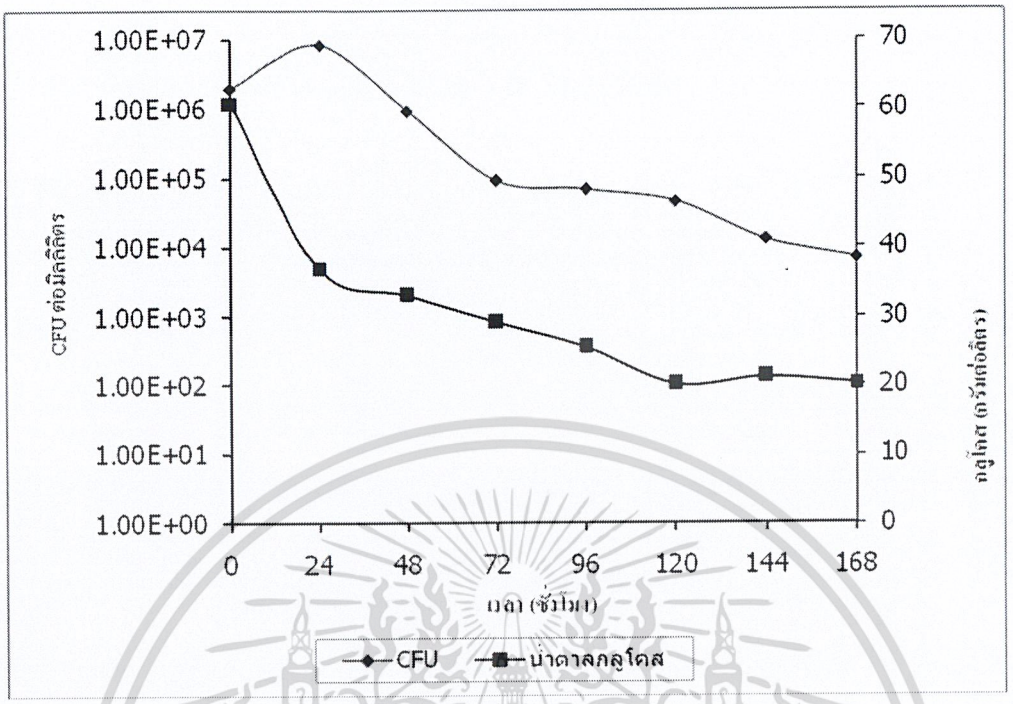
ตารางที่ 4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

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

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

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (—◆—) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (—■—) ในอาหารอุดม P2

4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส

เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 ของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบ ดำเนินวิธีการทดลองแบบเดียวเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

4.2.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. beijerinckii* ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

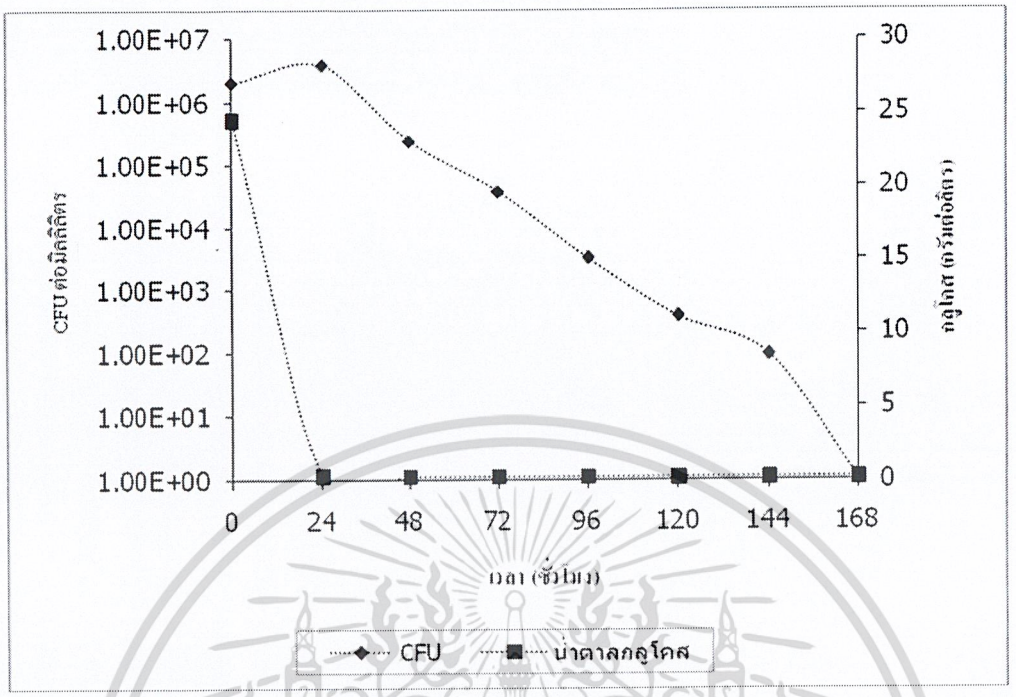
ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C .beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

4.2.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *C.Beijerinckii* ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัม ต่อลิตร

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.09×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 95 จากนั้น ในเวลา 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 และ360 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีการลดจำนวนลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท ซึ่งก็คือกลีเซอรอล ปริมาณกลีเซอรอลลดลงอย่างช้าๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยในชั่วโมงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 360 กลีเซอรอลถูกใช้ไปจนหมด

ตารางที่ 4.3 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

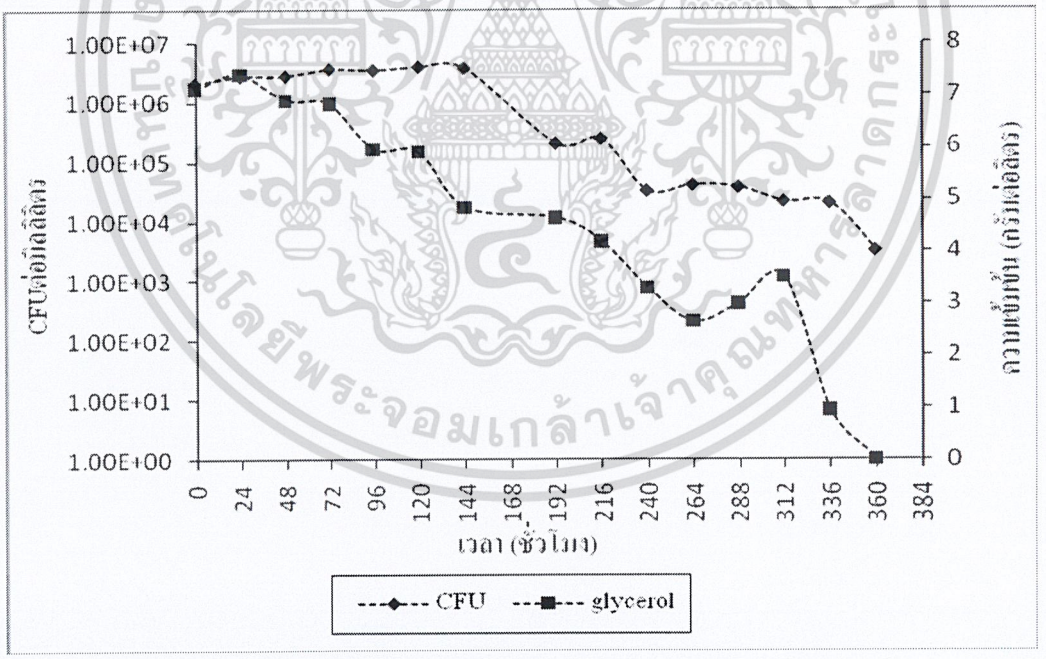
ตารางที่ 4.3 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ต่อ)

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
336	$(2.03 \pm 0.05 \times 10^{4})^{f}$	0.94 ± 0.62^{ef}
360	$(3.24 \pm 0.24 \times 10^{3})^{f}$	0^{f}

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

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด



รูปที่ 4.3 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (--◆--) และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ C .*beijerinckii* TISTR 1390 (····■····) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3) เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป จำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากกลูโคสที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 3.93×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 24 ชั่วโมงและค่อยๆ ลดจำนวนลง อันน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้

มีรายงานผลกระทบของความเข้มข้นของสารอาหารในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามรายงานของ Maddox (1995) กล่าวว่า การจำกัดสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะจะทำให้การเจริญของเซลล์ถูกจำกัดเพราะเกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญไปแม้ว่าจะทราบความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น แต่ก็ไม่ทราบความเข้มข้นของสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักและหลังจากกระบวนการหมัก

4.3 การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

4.3.1 ผลการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อ*C.Beijerinckii* ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 120 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 168 และมีการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลตลอดการเพาะเลี้ยง เนื่องมาจากสารนี้พบได้ในเมตาบอริซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.5 โดยมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.21 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

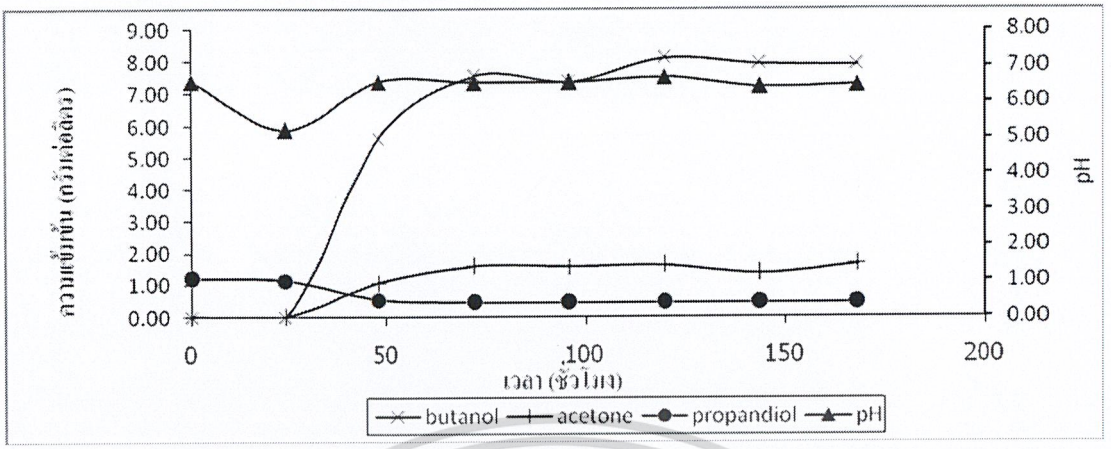
ตารางที่ 4.4 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

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

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

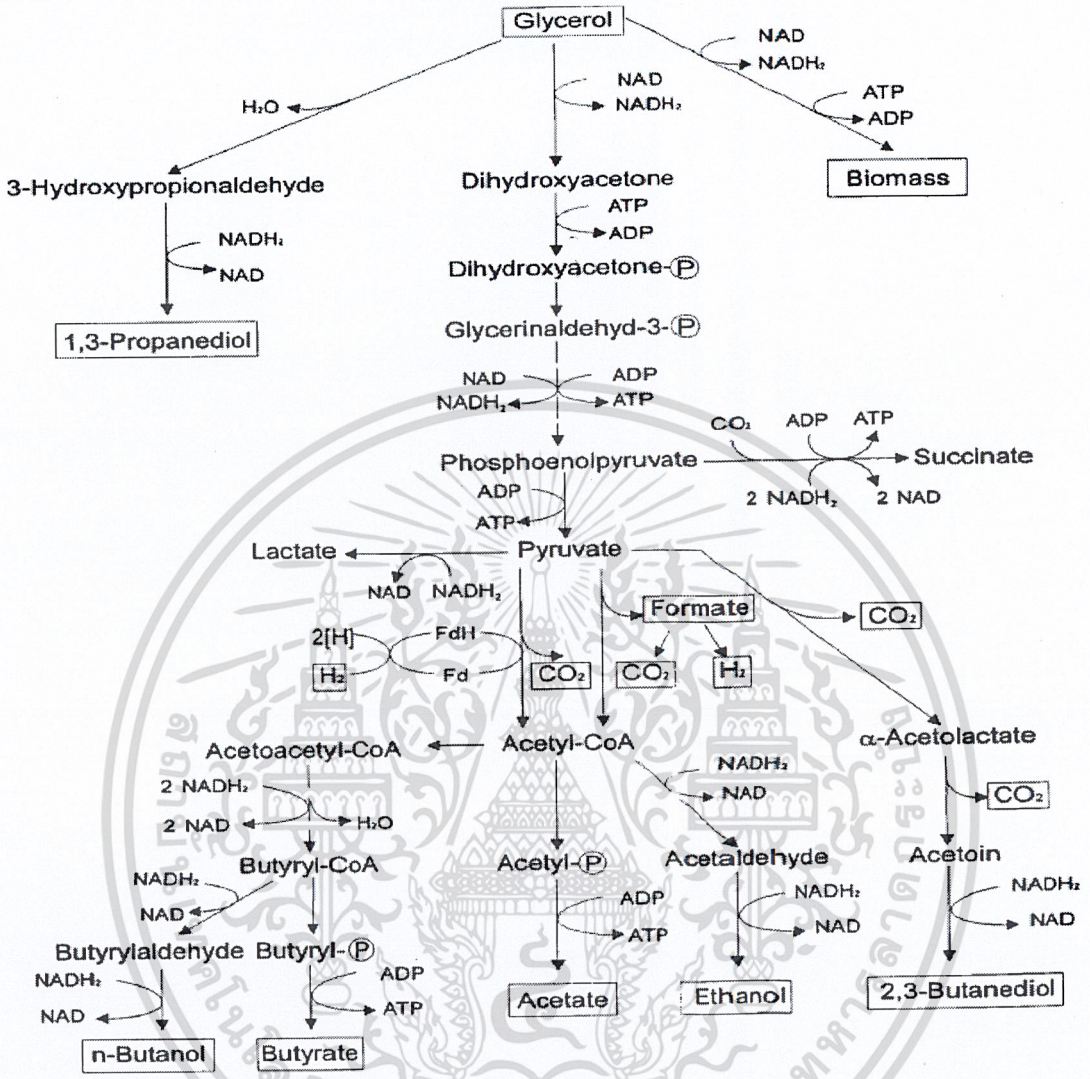
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—×—) อะซีโตน (—+—) 1,3 โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลเท่านั้น ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตน กับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม

ที่มา : Biebl และคณะ, 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อ *C. beijerinckii* ในอาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.5 กับ 4.6 และรูปที่ 4.6 กับ 4.7 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *C. beijerinckii* สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.15 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้อาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.57 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 2 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.5 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

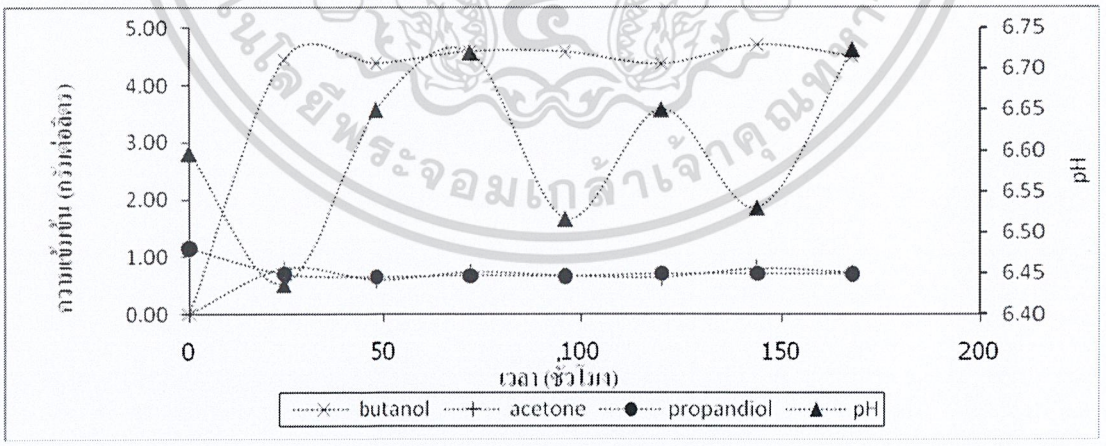
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.53	0^{b}	0^{c}	1.15 ± 0.03^{a}
24	6.44	4.45 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.11^{a}	0.70 ± 0.03^{bc}
48	6.65	4.39 ± 0.23^{a}	0.59 ± 0.18^{b}	0.65 ± 0.01^{d}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ต่อ)

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
72	6.72	4.60 ± 0.11^{a}	0.73 ± 0.04^{ab}	0.67 ± 0.02^{bcd}
96	6.52	4.59 ± 0.25^{a}	$0.67 \pm 0.08^{a\,b}$	0.66 ± 0.02^{cd}
120	6.65	4.37 ± 0.14^{a}	0.64 ± 0.07^{ab}	0.71 ± 0.01^{b}
144	6.53	4.70 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.09^{a}	0.71 ± 0.02^{b}
168	6.72	4.50 ± 0.22^{a}	0.72 ± 0.05^{ab}	0.70 ± 0.01^{bc}

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



รูปที่ 4.6 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—×—) อะซีโตน (—+—) 1,3โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.70	0^{e}	1.57 ± 0.01^{a}
24	6.44	0^{e}	1.39 ± 0.01^{b}
48	6.80	2.41 ± 0.16^{bcd}	0.92 ± 0.08^{d}
72	6.60	1.75 ± 0.06^{d}	1.19 ± 0.02^{c}
96	6.88	2.94 ± 0.13^{abc}	0.73 ± 0.02^{e}
120	6.60	3.13 ± 0.14^{abc}	0.70 ± 0.05^{e}
144	5.72	3.17 ± 0.15^{abc}	0.65 ± 0.03^{ef}
168	5.22	3.74 ± 0.32^{a}	0.61 ± 0.04^{f}
192	6.66	3.32 ± 0.30^{ab}	0.60 ± 0.01^{f}
216	5.33	3.68 ± 0.25^{a}	0.59 ± 0.01^{f}
240	4.89	3.42 ± 0.27^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
264	4.77	3.57 ± 0.28^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
288	5.10	3.63 ± 0.13^{a}	0.62 ± 0.02^{f}
312	5.36	3.80 ± 0.38^{a}	0.58 ± 0.04^{f}

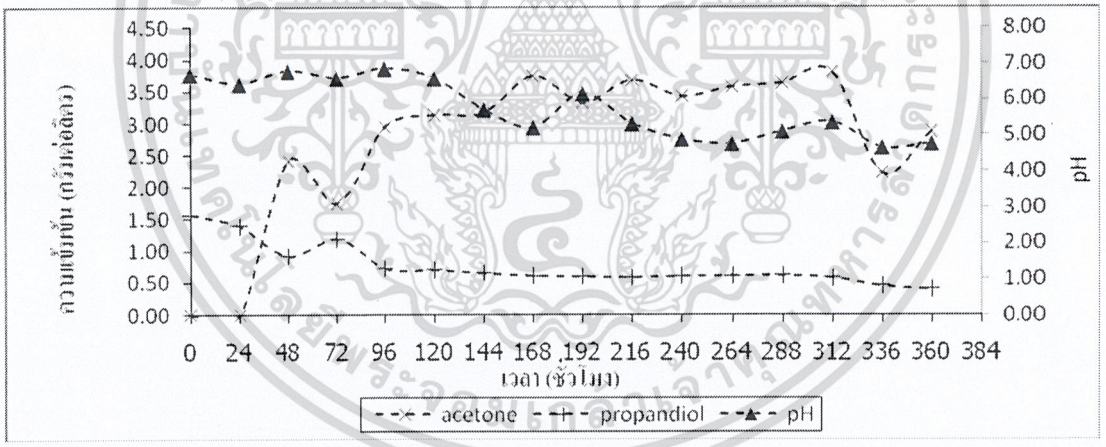
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ต่อ)

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
336	4.65	2.21 ± 0.97^{cd}	0.45 ± 0.14^{g}
360	4.77	2.86 ± 0.09^{abc}	0.40 ± 0.01^{g}

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

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.7 ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (--×--) 1,3โพรเพนไดออล (--+--) และค่าความเป็นกรดด่าง (--▲--) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรายงานของ Fermanek และคณะ (1997) พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซิโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อP2กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของมอลโตเดร็กส์ติน (maltodextrin) หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Qureshi และคณะ(2008) พบว่าเมื่อเติมกลูโคสปริมาณ 58.8 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 จะสามารถผลิตอะซีโตนได้ 5.44 กรัมต่อลิตร บิวทานอลเป็น 15.21 กรัมต่อลิตร และเอทานอลเป็น 0.41 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักกลูโคสจะถูกใช้ไป 51.4 กรัมต่อลิตร ภายหลังปริมาณกลูโคสจะเหลือเท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

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

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

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

การทำวิจัยครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับฟลาสก์อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้มาก เนื่องจากควบคุมสภาวะภายในได้ยาก จึงควรที่จะทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

มณีนาฏ ลีนุตพงษ์. 2527. อิทธิพลของการเติมบิวทานอลและกรดบิวทีริกที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียมที่แยกได้จากดินในประเทศไทย.ปัญหาพิเศษของนักศึกษาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก.กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ศูนย์หนังสือกรุงเทพ.

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

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

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.

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

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

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

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

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

Jones DT., Woods DR. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol. Rev. 50,484-524

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

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

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

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

Maddox IS, Qureshi N, Roberts-Thomson K. Production of acetone–butanol-ethanol from concentrated substrates using Clostridium acetobutylicum in an integrated fermentation-product removal process. Process Biochemistry 1995;30:209–15.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Spivey MJ.1978.The acetone/butanol/ethanol fermentation. J. Proc. Biochem. 13, 2-5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

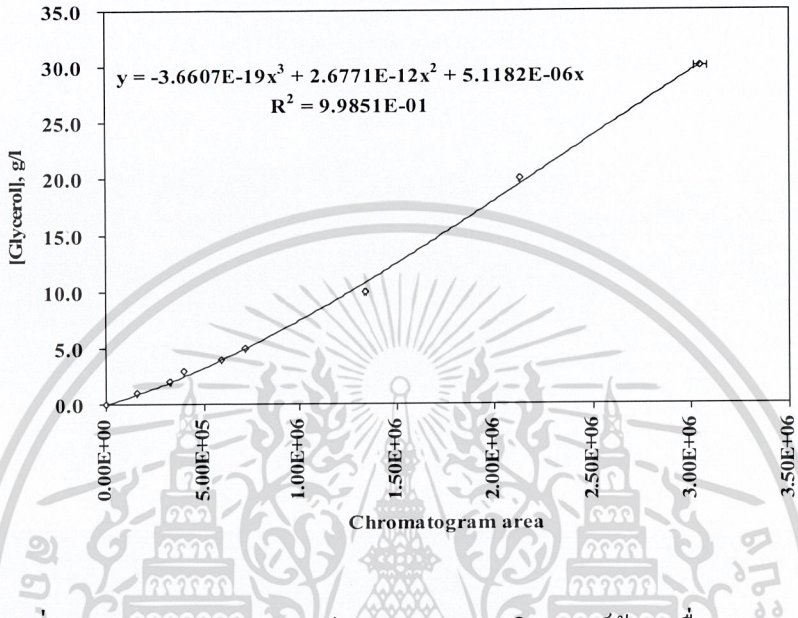
[Online].Available: www.vcharkarn.com/vcafe/35533 (25/03/2554)

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

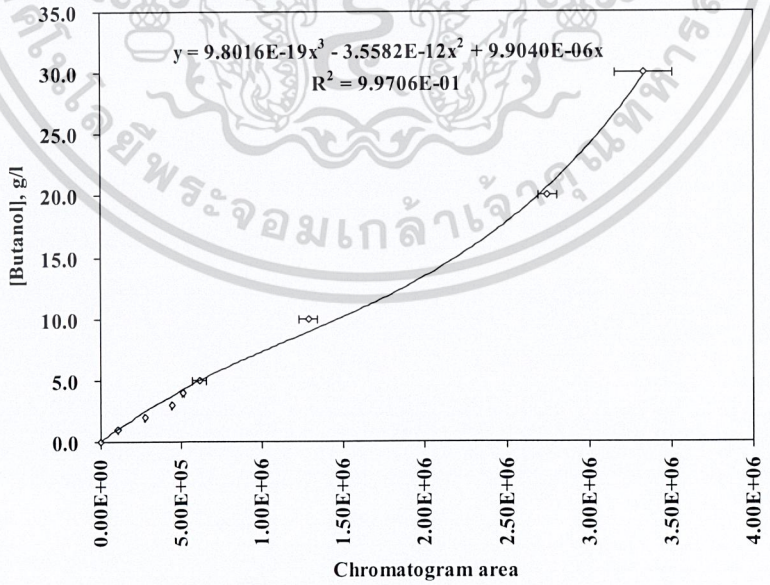
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

กราฟมาตรฐานของสารต่างๆ

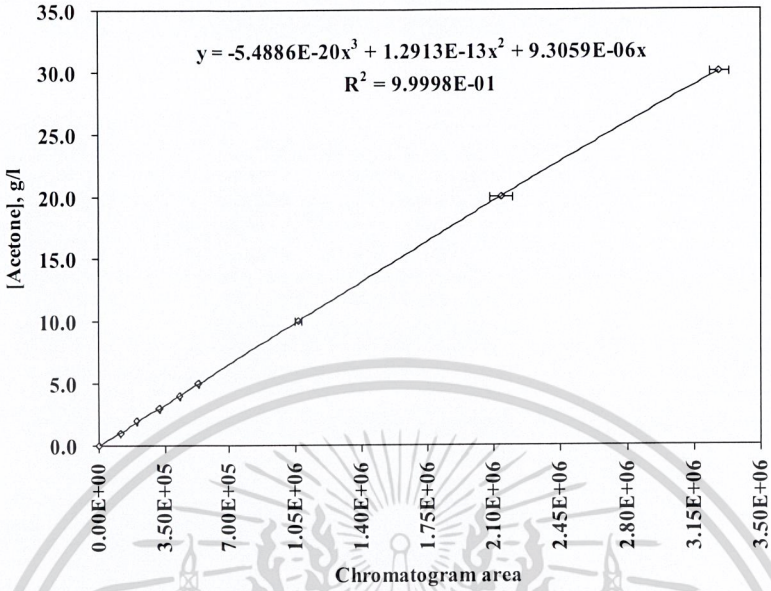


รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

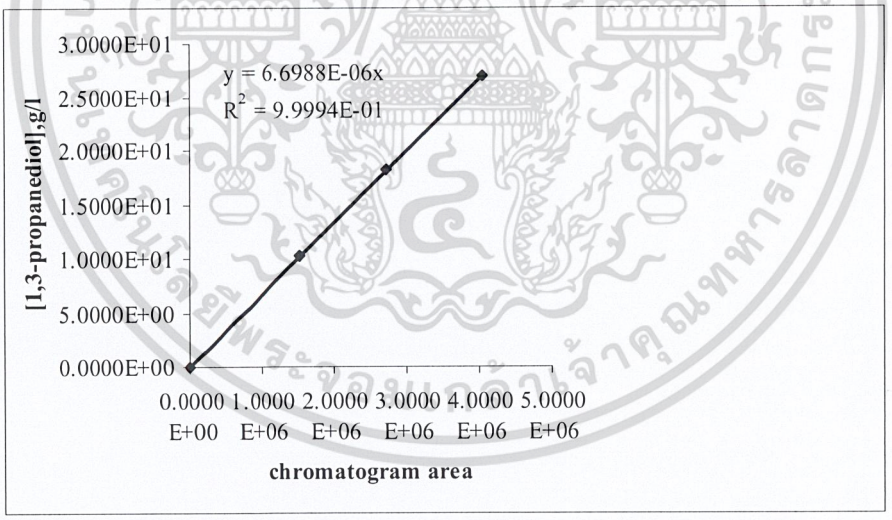


รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

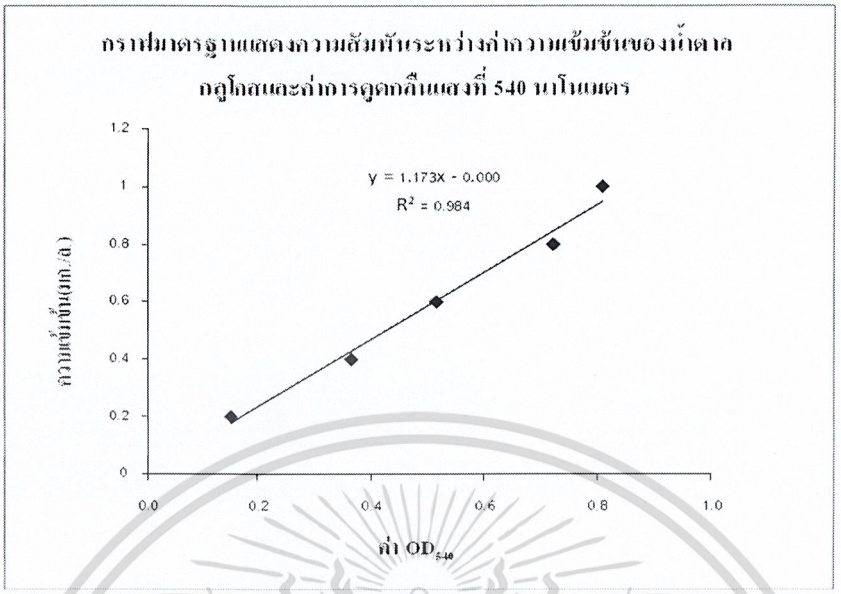


รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของอะซีโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของ1,3-โพรเพนไดออลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ก.6 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ บิวทานอลมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

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

ANOVA

cell (CFU/ml)

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหารP2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

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

ANOVA

cell (CFU/ml)

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cell (CFU/ml)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหารP2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

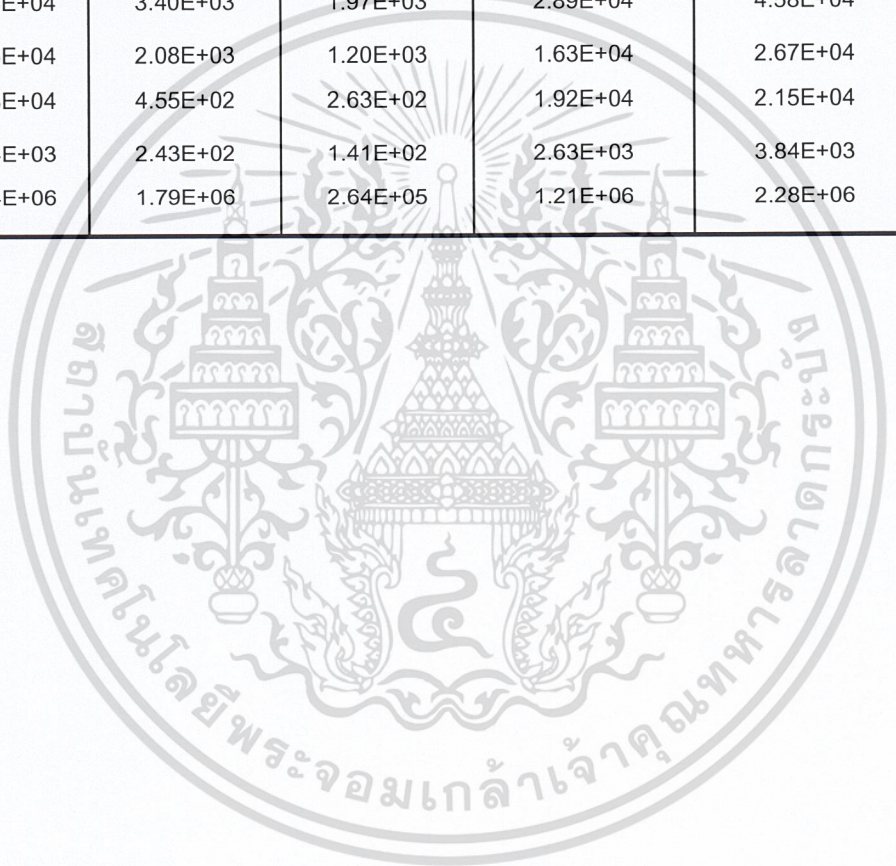
Oneway

Descriptives

cell (CFU/ml)

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

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



ANOVA

cell (CFU/ml)

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

Glucose (g/L)

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

ANOVA

Glucose (g/L)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

glucose (g/l)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

Glucose (g/L)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

Glucose (g/L)

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

glucose (g/l)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

glycerol (g/l)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

glycerol

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

Post Hoc Tests
Homogeneous Subsets

Glycerol (g/l)

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
butanol	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	48	3	5.6100	.54745	.31607	4.2501	6.9699	4.98	5.97
	72	3	7.5533	.39577	.22850	6.5702	8.5365	7.31	8.01
	96	3	7.3767	.21595	.12468	6.8402	7.9131	7.15	7.58
	120	3	8.1167	.64856	.37445	6.5055	9.7278	7.37	8.54
	144	3	7.9433	.63011	.36379	6.3781	9.5086	7.44	8.65
	168	3	7.8967	.31501	.18187	7.1141	8.6792	7.58	8.21
	Total	24	5.5621	3.38269	.69049	4.1337	6.9905	.00	8.65
acetone	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	48	3	1.0727	.22830	.13181	.5055	1.6398	.83	1.28
	72	3	1.5900	.16462	.09504	1.1811	1.9989	1.40	1.69
	96	3	1.5767	.04041	.02333	1.4763	1.6771	1.54	1.62
	120	3	1.6300	.08544	.04933	1.4178	1.8422	1.54	1.71
	144	3	1.3700	.12767	.07371	1.0528	1.6872	1.26	1.51
	168	3	1.6500	.15133	.08737	1.2741	2.0259	1.48	1.77
	Total	24	1.1112	.68793	.14042	.8207	1.4017	.00	1.77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

butanol

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acetone

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
butanol	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	4.4500	.19698	.11372	3.9607	4.9393	4.23	4.61
	48	3	4.3867	.23438	.13532	3.8044	4.9689	4.12	4.56
	72	3	4.5967	.11372	.06566	4.3142	4.8792	4.47	4.69
	96	3	4.5867	.24542	.14170	3.9770	5.1963	4.44	4.87
	120	3	4.3733	.14189	.08192	4.0209	4.7258	4.22	4.50
	144	3	4.7033	.20257	.11695	4.2001	5.2065	4.54	4.93
	168	3	4.5033	.21779	.12574	3.9623	5.0444	4.26	4.68
	Total	24	3.9500	1.53665	.31367	3.3011	4.5989	.00	4.93
acetone	0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24	3	.7920	.10886	.06285	.5216	1.0624	.67	.87
	48	3	.5913	.17885	.10326	.1471	1.0356	.39	.70
	72	3	.7310	.04084	.02358	.6295	.8325	.70	.78
	96	3	.6673	.08394	.04846	.4588	.8759	.61	.76
	120	3	.6373	.07401	.04273	.4535	.8212	.56	.71
	144	3	.7927	.09438	.05449	.5582	1.0271	.71	.90
	168	3	.7210	.04857	.02804	.6003	.8417	.67	.77
	Total	24	.6166	.25938	.05295	.5071	.7261	.00	.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANOVA

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

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

butanol

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acetone

Duncan[a]

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

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้