# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

# การปรับสภาพและการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

# PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF TARO PEEL SKIN FOR *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* CULTIVATION


นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์



งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย

จากทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)** | **การปรับสภาพและการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*** |
| **แหล่งเงิน** | **ทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ** |
| **ประจำปีงบประมาณ** | **2560** **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท** |
| **ระยะเวลาทำการวิจัย** | **1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2559 ถึงกันยายน 2560** |
| **ชื่อ-สกุล** | **นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์** |
| **หน่วยงานต้นสังกัด** | **ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์** |

## บทคัดย่อ


**โครงการวิจัยนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาองค์ประกอบของเปลือกเผือก สภาวะในการปรับสภาพ และสภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยจากการทดลองพบว่าเปลือกเผือกมีเยื่อใยหยาบร้อยละ 3.35 ไขมันร้อยละ 0.74 เถ้าร้อยละ 0.52 โปรตีนร้อยละ 6.75 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 77.00 นอกจากนี้ยังมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 7.67 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8.7 และลิกนินร้อยละ 3.65 ทำการปรับสภาพเปลือกเผือกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยกรดซัลฟิวริก 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ หรือน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 psi เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำของแข็งมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดด้วยเบสคือ 9.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยง จึงทำการเปลี่ยนวิธีโดยทำการนำเปลือกเผือกไปทำให้เกิด Gelatinization แล้วจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 8.54 กรัมต่อลิตร จึงเปลี่ยนวิธีมาเป็นการใช้เอนไซม์ผสม คือ เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มเป็น 31.79 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์ คือ ใช้เปลือกเผือก 15 กรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ผสมที่มีปริมาตรของเอนไซม์เซลลูเลส 0.2 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 30.12 กรัมต่อลิตร จึงนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acrtobutylicum* DSM 792 โดยให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าได้เอทานอลสูงสุดชั่วโมงที่ 24 ความเข้มข้น 0.69 กรัมต่อลิตร และบิวทานอลสูงสุด 0.0719 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง**



**คำสำคัญ** : การย่อยด้วยเอนไซม์, **การหมักที่สภาวะไร้อากาศ, แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*,** เปลือกเผือก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Treatment and enzymatic hydrolysis of taro peel for the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792
Researcher: Miss Vorapat Sanguanchaipaiwong
Faculty: Science Department: Biology

## ABSTRACT

This research was conducted to study the composition of the taro peel treatment conditions as well as the optimization of enzymatic hydrolysis for the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. The results showed that the taro peel contained crude fiber 3.35%, fat 0.74%, ash 0.52%, protein 6.75% and carbohydrate 77.00%. In additions, there were 7.67% cellulose, 8.7% hemicellulose and 3.65% lignin in taro peel samples. Taro peel was pretreated with 1M $H_2SO_4$, 1M NaOH or distilled water at 121°C, 15 psi for 20 min and hydrolyzed by 1 mL cellulase per 1 g of sample. The basic pretreatment provided the highest concentrations of reducing sugar of 9.64 g/L, which was inadequate for microorganism cultivation. Subsequently, taro peel was gelatinized and hydrolyzed by α-amylase and glucoamylase. The amount of reducing sugar obtained from amylase was 8.54 g/L. As a consequence, the mixed enzymes, celllulase, α-amylase and glucoamylase, were utilized and the reducing sugar content was 31.79 g/L. Afterwards, the optimization of enzymatic hydrolysis conditions was carried out. The optimal conditions were 15 g taro peel and 0.2 mL cellulose per 1 g of taro peel. The concentration of reducing sugars gained from this procedure was 30.12 g/L, then this taro peel hydrolysate was utilized as carbon source for the cultivation of Clostridium acetobutylicum DSM 792 with 50 g/L reducing sugars. It has been found that the highest concentrations of ethanol and butanol were 0.69 g/L at 24 h and 0.072 g/L at 48 h, respectively.

**Keyword**: anaerobic fermentation, Clostridium acetobutylicum, enzymatic hydrolysis, taro peel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และสำเร็จได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ชีววิทยา ที่ให้ความกรุณา ในการเบิกอุปกรณ์ ดูแลความเรียบร้อย อีกทั้งเป็นธุระในการติดต่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกเวลาราชการ นักศึกษาโครงงานพิเศษที่มีส่วนร่วมทำงานงานวิจัยชิ้นนี้ โดยเฉพาะนางสาวสิริมา สัตย์ชาพงษ์ นางสาวอภิญญา สุทธิสารศักดิ์ และนางสาวอรวรรณ เทียบภู

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบวัตถุดิบ

ขอขอบพระคุณ คุณสิริธร ธีระเวทย์ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ในเก็บรักษาและฝากเชื้อ

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิจัย ขอขอบพระคุณบุพการีที่ได้อบรมเลี้ยงดู และคอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุน และให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งเสมอมา

ผู้จัดทำรายงานวิจัย

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ญ
คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ฏ
**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 3
**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3
2.1 เผือก ..... 4
2.1.1 ประโยชน์ของส่วนประกอบของส่วนต่างๆของเผือก ..... 4
2.1.1.1 หัวเผือก ..... 4
2.1.1.2 ใบและยอดเผือก ..... 5
2.1.1.3 เนื้อเผือก ..... 5
2.2 ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ..... 5
2.2.1 เซลลูโลส (Cellulose) ..... 6
2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ..... 6
2.2.3 ลิกนิน (Lignin) ..... 7
2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment) ..... 8
2.3.1 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ..... 9
2.3.1.1 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางกายภาพ (physicalpretreatment) ..... 9
2.3.1.2 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ (physico-chemical pretreatment) ..... 9
2.3.1.3 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (chemical pretreatment) ..... 9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า


2.3.1.4 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biologicalpretreatment) ..... 10
2.4 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ..... 10
2.4.1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ..... 10
2.4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส ..... 12
2.4.3. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ..... 12
2.4.3.1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ..... 12
2.5 เอนไซม์อะไมเลส ..... 13
2.5.1 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส ..... 13
2.5.1.1 แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) ..... 13
2.5.1.2 บีตา-อะไมเลส (β-amylase) ..... 14
2.5.1.3 แกมมา-อะไมเลส (γ-amylase) ..... 14
2.6 การเกิดเจลลาติไนเซชัน (Gelatinization) ..... 14
2.7 บิวทานอล ..... 15
2.7.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล ..... 15
2.7.2 การผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ ..... 16
2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักในการผลิตบิวทานอล ..... 17
2.7.3.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น ..... 17
2.7.3.2 อุณหภูมิ ..... 18
2.7.3.3 ออกซิเจน ..... 18
2.7.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ..... 18
2.7.4 การนำบิวทานอลมาใช้ประโยชน์ ..... 18
2.8 *Clostridium acetobutylicum* ..... 19
2.8.1 อนุกรมวิธาน ..... 20
2.8.2 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ..... 20
2.8.3 คุณสมบัติทางชีวเคมี ..... 22
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 24
**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 28
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ ..... 28
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 28
3.1.2 สารเคมี ..... 28
3.1.3 อุปกรณ์ ..... 28
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 29


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)


หน้า

3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM) ..... 29
3.2.2 อาหาร glucose–yeast extract–casein–cysteine (GYCC)..... 30
3.3 วัตถุดิบ ..... 30
3.3.1 เปลือกเผือก..... 30
3.3.2 การเตรียมเปลือกเผือก..... 30
3.4 กระบวนการปรับสภาพเปลือกเผือก..... 30
3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น..... 30
3.4.2การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก..... 31
3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซม์..... 31
3.5 กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์..... 31
3.5.1 การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 31
3.5.2 การย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส..... 31
3.5.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ผสม..... 32
3.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก..... 32
3.6.1 ปริมาณเปลือกเผือก..... 32
3.6.2 ปริมาณเอนไซม์ ACCELLERASE1500..... 32
3.6.3 การใช้น้ำและบัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์..... 32
3.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*..... 33
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 33
3.7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ..... 33
3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่าง..... 34
3.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (Proximate analysis)..... 34
3.8.1.1 ปริมาณความชื้น..... 34
3.8.1.2 ปริมาณโปรตีน..... 34
3.8.1.3 ปริมาณไขมัน..... 35
3.8.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ..... 35
3.8.1.5 ปริมาณเถ้า..... 36
3.8.2 ปริมาณเซลลูโลส แฮมิเซลลูโลส และลิกนิน..... 36
3.8.2.1 ปริมาณเซลลูโลส..... 36
3.8.2.2 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส..... 38
3.8.2.3 ปริมาณลิกนิน..... 38
3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี..... 39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า


3.8.3.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) ..... 39
3.8.3.2 น้ำหนักชีวมวลแห้ง ..... 39
3.8.3.3 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังปรับสภาพ
โดยใช้เครื่อง HPLC ..... 39
3.8.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอินทรีย์อื่นๆ ..... 40
3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ ..... 40
**บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล ..... 41**
4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบของเลือกเผือก ..... 42
4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือก ..... 42
4.2 การศึกษาการปรับสภาพและการย่อยเบื้องต้น ..... 43
4.2.1 การปรับสภาพเปลือกเผือกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ ..... 43
4.2.2 การย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ..... 43
4.2.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ผสม ..... 44
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก ..... 45
4.3.1 ปริมาณเปลือกเผือก ..... 45
4.3.2 ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลส ..... 47
4.3.3 การใช้บัฟเฟอร์และน้ำกลั่นในการเตรียมเอนไซม์อะไมเลส ..... 48
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ..... 50
4.4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ..... 50
4.4.2 การสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ..... 52
**บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ ..... 57**
5.1 สรุปผลการวิจัย ..... 57
5.2 ข้อเสนอแนะ ..... 58
**เอกสารอ้างอิง ..... 59**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

**ตารางที่** **หน้า**


2.1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ..... 12
2.2 สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล ..... 16
2.3 สมบัติทางเชื้อเพลิงของบิวทานอล ..... 16
4.1 ส่วนประกอบของเปลือกเผือกที่ใช้ในการทดลอง ..... 42
4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ..... 44
4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโออะไมเลส โดยใช้เปลือกเผือกในปริมาณที่แตกต่างกัน ..... 46
4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน ..... 47
4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้ตัวทำละลายในการเตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกัน ..... 49
4.6 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม ..... 49
4.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 51
4.8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และและค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง*Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างเปลือกเผือกความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 52
4.9 ความเข้มข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นของกรดแลคติกจากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 55
4.10 ความเข้มข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นของกรดแลคติกจากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 55


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง (ต่อ)

**ตารางที่** **หน้า**

4.11 ความเข้มข้นของบิวทานอล และความเข้มข้นของเอทานอลที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 56

4.12 ความเข้มข้นบิวทานอล และความเข้มข้นของเอทานอลที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ..... 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


**รูปที่** **หน้า**

2.1 ลักษณะต้นเผือกที่ประกอบด้วย ใบ ต้น หัว และราก ..... 5

2.2 โครงสร้างของเซลลูโลส

(ก) โครงสร้างทางเคมี ..... 6

(ข) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ..... 6

2.3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส ..... 7

2.4 สูตรโครงสร้างของ

(a) trans-coniferyl alcohol ..... 7

(b) trans-p-sinapyl alcohol ..... 7

(c) tran-pcoumaryl alcohol ..... 7

2.5 กระบวนการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส ..... 8

2.6 วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส ..... 8

2.7 กลไลการทำปฏิกิริยาการย่อยสายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส ..... 11

2.8 โครงสร้างบิวทานอล ..... 15

2.9 รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* sp. ..... 19

2.10 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* sp. ..... 21

2.11 วิถีทางชีวเคมีของ *Clostridium acetobutylicum* ลูกศรชนิดหนาแสดงปฏิกิริยาในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ลูกศรชนิดบางแสดงปฏิกิริยาในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ..... 23

4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ..... 45

4.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสหลังการย่อยเปลือกเผือกในปริมาณที่แตกต่างกันด้วยเอนไซม์ผสม ..... 46

4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่แตกต่างกัน ..... 48

4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมเซลลูเลส ACCELLERASE1500 แอลฟา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และค่าพีเอช ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum DSM 792* ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่างๆ ..... 51



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)

**รูปที่** **หน้า**

4.5 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* *DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพราะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน

(ก) ความเข้มข้นกรดอะซิติก ..... 53

(ข) ความเข้มข้นเอทานอล ..... 53

(ค) ความเข้มข้นกรดแลคติก ..... 53

4.6 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* *DSM 792* ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือเปลือกเผือก ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพราะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง ไร้ออกซิเจน

(ก) ความเข้มข้นกรดอะซิติก ..... 54

(ข) ความเข้มข้นเอทานอล ..... 54

(ค) ความเข้มข้นกรดแลคติก ..... 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำย่อและสัญลักษณ์

| คำย่อ/สัญลักษณ์ | คำอธิบาย |
|---|---|
| ABE | Acetone-butanol-ethanol |
| ADF | Cellulose + Lignin |
| ADL | Lignin |
| AFEX | Ammonia Fiber Explosion |
| ATP | Adenosine 5'-tri-phosphate |
| $C_5$ | Pentose |
| °C | Degree Celsius |
| CoA | Coenzyme A |
| $C_4H_9OH$ | Butanol |
| DNS | 3,5dinitrosalicylic acid |
| E.C. | Enzyme Classification |
| Emp | Embden-Meyerhof Pathway |
| g | Gram (s) |
| g/g | Gram (s) per Gram |
| g/L | Gram (s) per Liter |
| GYCC | Glucose-Yeast Extract-Casein-Cysteine |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| M | Molar |
| ml (มล.) | milliliter (s) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| MPa | MegaPascal |
| NAD | Nicotinamide adenine dinucleotide (Oxidized form) |
| NADH | Reduced form of Nicotinamide adenine dinucleotide |
| NDF | Cellulose + Hemicellulose + Lignin |
| NFE | Nitrogen Free Extract Crude Fiber |
| pH | Positive Potential of the Hydrogen ions |
| % (w/v) | Percentage weight by volume |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการแปรสภาพชีวมวล (biomass conversion) เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) และสารเคมี (biochemicals) ด้วยกระบวนการหมัก (fermentation) หรือการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ (biocatalysis) มีบทบาทสำคัญมากขึ้น (อุกฤษฏ์ และคณะ, 2555) จากในหลายปีที่ผ่านมามีการใช้พลังงานเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของประชากรทำให้ความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ส่งผลให้น้ำมันปิโตรเลียมในโลกลดปริมาณลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการหาแหล่งพลังงานใหม่หรือพลังงานทดแทนจึงได้รับความสนใจมากขึ้นและกลายเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ ก่อนหน้านี้พลังงานทดแทนที่ได้รับความนิยมและมีการพัฒนาคือเอทานอล ซึ่งเป็นไบโอแอลกอฮอล์ที่ได้รับการศึกษาวิจัยและนำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย (ชนิกา และคณะ, 2555)

ในปัจจุบันบิวทานอลได้รับความสนใจและได้รับการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในปัจจุบันบิวทานอลได้รับความสนใจและได้รับการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไบโอบิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับก๊าซโซลีน (น้ำมันเบนซิน) มากกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล นอกจากนี้ บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับก๊าซโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ (ชนิกา และคณะ, 2555) ซึ่งบิวทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล (Molasses), สารชีวมวลทางการเกษตร (Agricultural biomass), ไม้ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ และวัตถุดิบประเภทที่ให้แป้ง (Starchy material) เช่นข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวไรย์ และมันสำปะหลัง) ของเสียจากอุตสาหกรรมนม (Dairy industry waste) เป็นต้น (สุนทร และอภิชัย, 2555)

เปลือกเผือก ถือได้ว่าเป็นอีกหนึ่งวัตถุดิบทางเลือก เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการนำหัวเผือกมาแปรรูป โดยส่วนใหญ่เมื่อปอกเปลือกเสร็จก็จะถูกทำไปทิ้งและกำจัดโดยกองไว้ให้เกิดการย่อยสลายตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นเวลานานกว่าที่วัสดุจะเกิดการย่อยสลาย เมื่อเวลาผ่านไปอาจส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์ ส่งผลต่อมลภาวะได้ในภายหลัง และเนื่องจากองค์ประกอบทั่วไปของเปลือกเผือกประกอบไปด้วยเส้นใยเซลลูโลส โดยการผลิตบิวทานอลจากเชื้อจุลินทรีย์จากวัตถุดิบที่มีเส้นใยเซลลูโลส ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพและการย่อยก่อน

โดยการย่อยจะได้ผลดีจะต้องมีเอนไซม์เข้ามาช่วยเร่งปฏิกิริยา โดยทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มสูงขึ้น $10^{-3}$-$10^{17}$ เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง สำหรับเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตมีหลายชนิด อย่างเช่นการย่อยแป้ง (starch) และไกลโคเจน (glycogen) เป็น โอลิโกแซกคาไรด์ หรือ มอลโตส (moltose) จะถูกย่อยโดย แอลฟา-อะไมเลส ($\alpha$ - amylase) หรือ อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซับซ้อน เช่น เซลลูโลส และ แพคติน เป็นโครงสร้างที่แข็งแรงย่อยยากต้องอาศัยเอนไซม์ที่ตัดพันธะไกลโคซิล เช่น เอนไซม์เซลลูเลส (วรพงษ์, 2554) จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* spp.

ทั้งนี้ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาศึกษาการสร้างบิวทานอล และถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สามารถสร้างสปอร์ และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยบิวทานอลเป็นผลิตผลหนึ่งที่ได้จากกระบวนการหมักเอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งประกอบด้วยอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (สุนทร และอภิชัย, 2555)

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาในการทำโครงงานวิจัยเกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตบิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งให้กลายเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีบทบาทสำคัญในการลดปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิงจากน้ำมันปิโตรเลียม เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และเป็นการลดปัญหาการกำจัดวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้อีกด้วย โดยในโครงการพิเศษนี้ได้เลือกใช้เปลือกเผือกมาศึกษาการปรับสภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ และการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่ถูกมองข้ามมาใช้ให้เกิดประโยชน์จึงควรที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตบิวทานอล เพราะนอกจากจะเป็นการลดการกำจัดเศษวัสดุที่เหลือทิ้งลงแล้วยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตพลังงานเชื้อเพลิงอีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเหมาะสมในการปรับสภาพของเปลือกเผือกและการนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อที่จะนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเปลือกเผือกที่ปรับสภาพแล้วมาเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เพื่อดูความเป็นไปได้ในการผลิตสารละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้จะศึกษาการเกี่ยวกับการปรับสภาพเปลือกเผือกด้วยกรด เบส และน้ำกลั่น ในระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) เพื่อที่จะนำเปลือกเผือกมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* หลังจากนั้นนำเปลือกเผือกที่ปรับสภาพแล้ว มาทำการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์อะไมเลส ทำการวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC โดยการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกเผือกมาเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในการเพาะเลี้ยงที่ใช้เป็นชุดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุม และใช้อาหาร glucose–yeast extract–casein–cysteine (GYCC) ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถที่จะช่วยลดปัญหาการกำจัดและเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้แก่เปลือกเผือก
2. ได้ศึกษาถึงกระบวนการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
3. ได้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อย มาผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
4. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

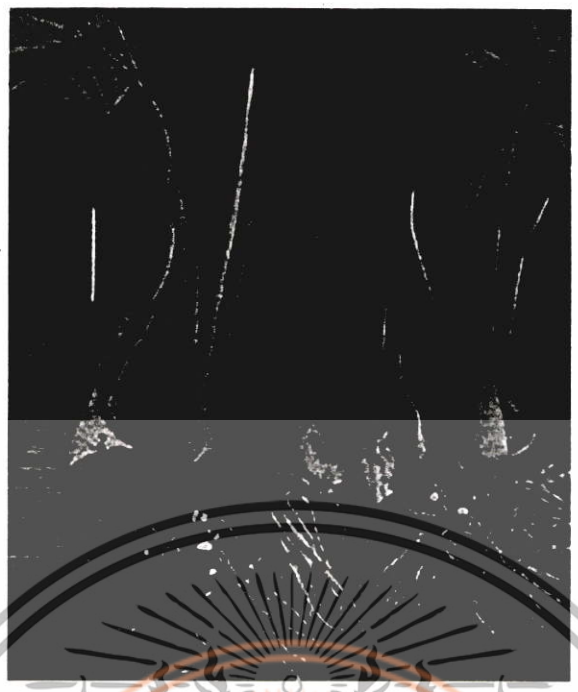
## 2.1 เผือก

เผือกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Colocasia esculenta* (L.) Schott และชื่อภาษาอังกฤษคือ ทาโร (Taro) นอกจากชื่อนี้ยังมีชื่ออื่นอีก คือ โอลด์โคโคแยม (Old Cocoyam) แดเชน หรือ แดชีน (Dashen หรือ Dasheen) และ เอดโด (Eddo หรือ Eddoe) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ สันนิษฐานว่าอาจมีการปลูกเผือกเป็นอาหารมาก่อนการปลูกข้าวเสียอีก ปัจจุบันมีการปลูกเผือกมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย จีน แอฟริกาและหมู่เกาะในอเมริกากลาง แต่มักปลูกเพื่อบริโภคในท้องถิ่นมากกว่าเพื่อการค้าในตลาดโลก เป็นพืชล้มลุกอายุยืนในวงศ์ Araceae มีลำต้นใต้ดินเป็นหัว รูปลูกข่างกลม สีน้ำตาล มีขนาดใหญ่ ถ้ามีหัวย่อยขนาดใหญ่จะมีจำนวนน้อย ถ้าหัวย่อยมีขนาดเล็กจะมีจำนวนมาก ใบเดี่ยว เรียงเวียน รูปลูกศรแกมรูปหัวใจ ดังรูปที่2.1 โคนใบแต่ละด้านกลมหรือเป็นเหลี่ยม ปลายใบแหลม เส้นใบเด่นชัด ก้านใบยาวได้ถึง 1 เมตร ช่อดอกเป็นช่อเชิงลดมีกาบ ออกเดี่ยวๆ หรือหลายช่อ ก้านช่อดอกยาวได้ถึง 15 เซนติเมตร สั้นกว่าก้านใบ กาบหุ้มช่อดอกยาว 15-35 เซนติเมตร ตั้งตรง สีเขียว ปลายกาบเรียวแหลมยาวคล้ายหาง สีเหลืองอ่อน ช่อดอกสั้นกว่ากาบ ผลสีเขียว นอกจากหัวเผือกซึ่งคือลำต้นใต้ดินที่เรียกว่าคอร์ม (corm) จะนำมาใช้ทำอาหารและขนมได้แล้ว ใบและก้านใบยังกินเป็นผักได้ แต่ในหัวและทั้งต้นมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) ซึ่งทำให้คันเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆในวงศ์เดียวกัน เช่น บุก และบอน ทุกส่วนจึงต้องผ่านการต้มหรือหมักก่อนจึงจะกินได้ (ศศิวิมล และคณะ, 2546)

### 2.1.1 ประโยชน์ของส่วนประกอบต่างๆ ของเผือก

**2.1.1.1 หัวเผือก** ประกอบด้วยแป้งมากมาย เนื้อละเอียด องค์ประกอบของหัวเผือกโดยประมาณ ได้แก่ ความชื้นร้อยละ 63-85 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 13-29 โปรตีนร้อยละ 1.4-3.0 ไขมันร้อยละ 0.16-0.36 เส้นใยร้อยละ 0.60-1.18 เถ้าร้อยละ 0.6-1.3 มีวิตามินซีมากประมาณ 7-9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของส่วนที่กินได้ ไทอามีนประมาณ 0.8 มิลลิกรัม ไรโบฟลาวิน 0.04 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.9 มิลลิกรัม เม็ดแป้งมีขนาดเล็กมาก ประกอบด้วยสองประเภท ประเภทหนึ่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 ไมครอน อีกประเภทหนึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 ไมครอน ด้วยเหตุนี้แป้งเผือกจึงย่อยง่าย แต่ไม่เหมาะที่จะใช้ในด้านอุตสาหกรรมแป้ง (ไสว และคณะ, 2523)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.1** ลักษณะต้นเผือกที่ประกอบด้วย ใบ ต้น หัว และราก
ที่มา: ไสว และคณะ (2523)

**2.1.1.2 ใบและยอดเผือก** ทั้งใบและยอดใช้เป็นผักได้ มีวิตามินเอ และวิตามินซีสูง ในใบมีวิตามินเอ 20,885 ไอ.ยู. (IU) ต่อ 100 กรัมของส่วนที่กินได้ มีวิตามินซี 142 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในยอดมีวิตามินเอ 335 ไอ.ยู.ต่อ 100 กรัม มีวิตามินซี 8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ไสว และคณะ, 2523)

**2.1.1.3 เนื้อเผือก** เนื้อมีสีต่างๆกันตามชนิด เนื้อเหนียวกว่ามันเทศ ส่วนใหญ่ใช้เป็นอาหารที่สำคัญของประชากรในหลายประเทศ เช่น ต้ม เผา อบ ทอด ตากแห้ง ทำขนมรับประทาน นอกจากนี้บางแห่งทำเป็นแป้ง เพื่อทำขนมปัง อาหารทารก เครื่องดื่ม ขนม ใช้เป็นอาหาร เพื่อป้องกันโรคแพ้บางอย่างในทารก และใช้แทนธัญพืชในการรักษาโรคเกี่ยวกับกระเพาะลำไส้ ใบอ่อน ก้านใบใช้รับประทานได้ บางประเทศใช้ใบอ่อน และก้านใบเผือกประกอบเป็นอาหารได้หลายอย่าง (ไสว และคณะ, 2523)

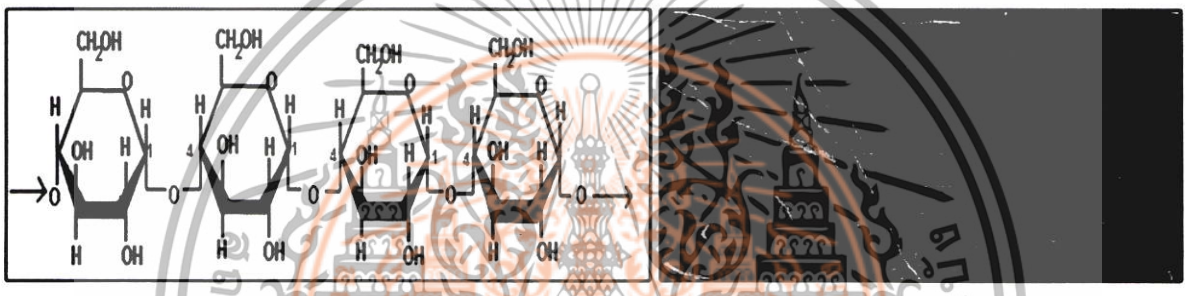
## 2.2 ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลส หมายถึง ชีวมวลอินทรีย์ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พบมากในผนังเซลล์ของพืชได้แก่ เศษวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เศษวัสดุจากการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด เส้นใยข้าวโพด ชานอ้อย แกลบ และพวกฟางข้าว ขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหารและจากบ้านเรือน รวมถึงมูลสัตว์ต่างๆ (อรุณี, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2.1 เซลลูโลส (Cellulose)**

เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบที่พบมากในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส โดยพบในส่วนของผนังเซลล์ของพืช อยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณที่พบแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนของพืช เช่น เนื้อไม้พบประมาณร้อยละ 40-50 และเส้นใยฝ้ายพบประมาณร้อยละ 98 เซลลูโลสเป็นโฮโมโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-Glucopyranose) เชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic bond) ดังรูปที่ 2.2 เกิดเป็นโพลิเมอร์กลูแคน (glucan) มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous celluloseโดยส่วนของ crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า amorphous cellulose (รัชพล, 2558)



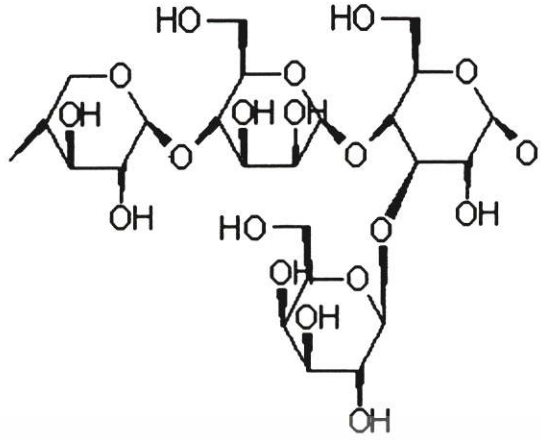
(ก) (ข)

**รูปที่** 2.2 โครงสร้างของเซลลูโลส ก) โครงสร้างทางเคมี ข) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
**ที่มา**: http://science.srru.ac.th/org/sci-elearning/courseonline/4022503/chapter3structural1.htm (วันที่สืบค้น 26 ธันวาคม 2558)

**2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)**

เฮมิเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบชนิดหนึ่งในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นเฮทเทอร์โรโพลิเมอร์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ หลายชนิดผสมกัน เช่น กลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส ซึ่งพบอยู่ในรูปโพลิเมอร์ไซแลน แมนแนน กาแลกแตน และอะราบิแนน (Bastawde และคณะ., 1992, รูปที่ 2.3) มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 200หน่วย โดยในพอลิเมอร์ไวแลน ดี-ไซโลสมีปริมาณมากที่สุดคือ ร้อยละ 85-93 ส่วนองค์ประกอบอื่น เช่น กลูโคส กรดกลูคิวโรนิก กรดกาแลคตูโรนิก จะพบปริมาณค่อนข้างน้อย โดยไซโลสที่พบจะเชื่อมด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

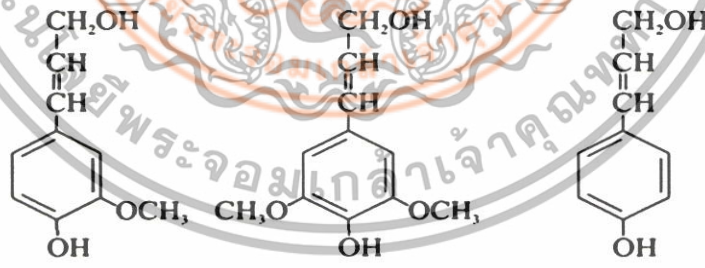


รูปที่ 2.3 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา : https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Hemicellulose.png (วันที่สืบค้น 26 มิถุนายน 2559)

2.2.3 ลิกนิน (Lignin)

ลิกนิน เป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซล์ของพืช พบในปริมาณที่แตกต่างไปตามชนิดของพืช ในธรรมชาติลิกนินเป็นส่วนป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลลินทรีย์ ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่ตกผลึก ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด ประกอบด้วย tran-p-coumaryl alcohol, trans-coniferyl alcohool และ trans-p-sinapyl alcohol ดังแสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่2.4 นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นอีกมากมาย เช่น vanillin และ syringaldehyde



(a) (b) (c)

**รูปที่ 2.4** สูตรโครงสร้างของ (a) trans-coniferyl alcohool (b) trans-p-sinapyl alcohol และ (c) tran-pcoumaryl alcohol

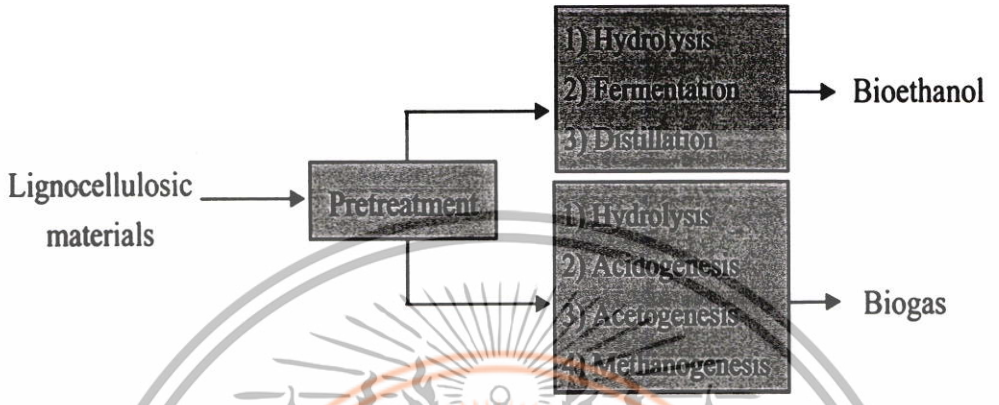
ที่มา : รัชพล (2558)

## 2.3 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

กระบวนการย่อยเซลลูโลสของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลนั้น การทำงานของเอนไซม์หรือกรดที่ใช้ในการย่อยนั้นมักถูกกีดขวางโดยปัจจัยทางกายภาพหรือเคมีหลาย

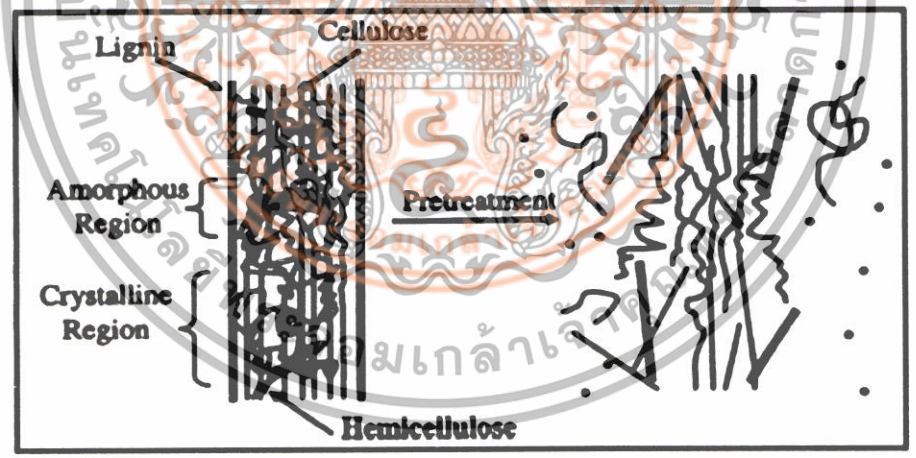
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประการเป็นผลให้ประสิทธิภาพในย่อยเซลลูโลสลดลง ด้วยเหตุนี้จึงต้องเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยเสียก่อน โดยอาศัยกระบวนที่เรียกว่าการปรับสภาพหรือการพรีทรีตเมนต์ (pretreatment) ดังรูปที่ 2.5 (ภูมิหทัย และคณะ, 2554)




รูปที่ 2.5 กระบวนการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/htm (วันที่สืบค้น 26 มิถุนายน 2559)




**รูปที่ 2.6** วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ที่มา: ภูมิหทัย และคณะ (2554)

กระบวนการปรับสภาพ คือการเปลี่ยนหรือการกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เป็นสิ่งกีดขวางต่อกระบวนการย่อยเซลลูโลส ส่งผลให้ประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้นและผลได้ของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการเปลี่ยนเซลลูโลส ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส วัตถุประสงค์ของกระบวนการปรับสภาพคือกำจัดลิกนินหรือเฮมิเซลลูโลสออก ลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส และ เพิ่มความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.3.1 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส** สามารถแบ่งออกได้ 4 กระบวนการหลัก ดังนี้

**2.3.1.1 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางกายภาพ (Physical pretreatment)** โดยการใช้แรงกล เช่น การบด การตัด เป็นต้น เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและลดขนาดอนุภาคของลิกโนเซลลูโลส นอกจากนี้ยังเป็นการลดผลึกของเซลลูโลสด้วยโดยทั่วไปควรลดขนาดวัตถุดิบหลังจากหั่นแล้วให้มีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และให้มีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร หลังจากการบดละเอียดแล้วพลังงานที่ต้องใช้ในการบดวัตถุดิบขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของชีวมวลที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่วิธีการปรับสภาพทางกายภาพ จะใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่นๆด้วย

**2.3.1.2 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical pretreatment)** เช่น การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion) ชีวมวลที่ผ่านการหั่นและบดแล้วจะถูกปรับสภาพต่อด้วยไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง หลังจากนั้นจึงลดความดันลงโดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะปาสคาล (MPa) ไว้ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลงให้เหลือเท่ากับความดันบรรยากาศซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนรูปลิกนิน และการระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Ammoniafiberexplosion) เป็นการทำให้ชีวมวลสัมผัสกับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงในระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง เป็นต้น

**2.3.1.3 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางเคมี (Chemical pretreatment)** เช่น การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis) กรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟิวริก และกรดไฮโดรคลอริกซึ่งเดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อยลิกโนเซลลูโลส แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมดังนั้นจึงใช้การเจือจางกรดในการปรับสภาพและพบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ (สุภาวดี, 2557)

การใช้ด่าง (Alkaline hydrolysis) ด่างที่นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์และปูนขาว โดยที่ด่างเหล่านี้สามารถแตกโครงสร้างของลิกนินและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส ซึ่งการปรับสภาพด้วยด่างเป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด (สุภาวดี, 2557)

การใช้โอโซน (ozonolysis) โอโซนสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสได้ แต่ใช้โอโซนปริมาณมากในกระบวนการปรับสภาพทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง (สุภาวดี, 2557)

**2.3.1.4 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)** โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์จำพวกรา เช่น ราขาว ราน้ำตาล เป็นต้น

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่ากระบวนการปรับสภาพถือเป็นเครื่องมือสำคัญในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้มีความเหมาะสมต่อกระบวนการย่อยกระบวนการปรับสภาพมีหลายกระบวนการ ซึ่งแต่ละกระบวนการนั้นก็จะส่งผลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกันดังนั้นการเลือกกระบวนการปรับสภาพมาใช้ในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบนั้นจำเป็นต้องทราบถึงชนิดของวัตถุดิบ โครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบอื่น ๆ ของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิดเสียก่อน แล้วจึงทำการเลือกระบวนการปรับสภาพให้เหมาะสมทั้งนี้เพื่อประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลส นอกจากนี้แล้วยังต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการดำเนินการอีกด้วย (ภูมิหทัยและคณะ, 2554)

## 2.4 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

### 2.4.1 การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เป็นกระบวนการย่อยสลายที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง เอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ที่ปนเปื้อนมา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาไม่รุนแรงซึ่งเอนไซม์ที่ถูกย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกรวมว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส เอนไซม์เซลลูเลส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกภายในโครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสหน่วยเล็กที่สุดหากการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส (ทิพวรรณ, 2554) เอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่ม ตามระบบการจัดจำแนกเอนไซม์ (Enzyme Classification (E.C)) ดังนี้

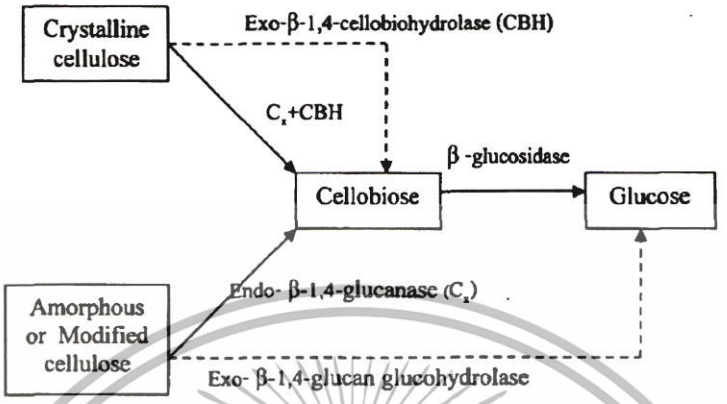
1. **เอนโดกลูคาเนส หรือเอนโด-บีต้า-1,4-กลูคาเนส** (E.C.3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose) เซลลูโลสที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับกรดฟอสฟอริก (phosphoric swollen cellulose) ไฮดรอกซีเอทิลเซลลูโลส (hydroxyethyl cellulose) และเซลโลโอลิโกเมอร์ (cello-oligomers) โดยตัดย่อยเซลล์ที่ตำแหน่ง พันธะบีต้า-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่ม (random) ทำให้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ( cellooligo-saccharides) เซลโลเพนธาโอส (cellopentaose) เซลโลไตรโอส (cellotriose) เซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส โดยจะได้ผลิตภัณฑ์หลักใดขึ้นอยู่กับสมบัติของแต่ละเอนไซม์ (ทิพวรรณ, 2554)

2. **เอกโซกลูคาเนส หรือเอกโซ-1,4-กลูคาเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-กลูแคนกลูโคไฮโดรเนส หรือเอกโซบีต้า-1,4-เซลโลไบโอไฮโดรเนส (E.C.3.2.1.91)** พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลเซลโลไบโอส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส (ทิพวรรณ, 2554)

3. **เอนไซม์บีต้า-1,4-กลูโคไซเนส** (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง (ทิพวรรณ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 2.7




**รูปที่** 2.7 กลไกการทำปฏิกิริยาการย่อยสายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส

ที่มา: ทิพวรรณ (2554)

ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ เช่น สัตว์ทะเลในกลุ่มเพรียงหัวหอม (tunicate) หอยทากยักษ์ (Achatinafulica) และจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็นโปรโตซัว แบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท และเชื้อรา จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สร้างเอนไซม์ เซลลูเลสที่มีความสามารถในการ ย่อยลสายแตกต่างกันขึ้นกับสภาวะแวดล้อมที่จุลินทรีย์เหล่านั้นเจริญอยู่ พบว่าเชื้อรา (celllulolytic fungi) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณที่มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่เป็นเอกซ์ตร้าเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular enzyme) คือ เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทำให้สะดวกต่อการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการย่อยสลายเซลลูโลส และสะดวกต่อการนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้ในการศึกษาหรือใช้ในอุตสาหกรรม (ทิพวรรณ, 2554)

### 2.4.2 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลสเป็น glycoprotein ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ co-factor หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ในช่วงกว้างประมาณ 4.8 ถึง 8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอน ด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน (ทิพวรรณ, 2554)

**2.4.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส**

**2.4.3.1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส**

**ตารางที่ 2.1** จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

| เชื้อรา | เชื้อแบคทีเรีย | เชื้อแอคติโนมัยสิท |
|---|---|---|
| *Alternaria* sp. | *Bacillus* sp. | *Microrrnonospora* sp. |
| *Aspergillus* sp. | *Cellulomonas* sp. | *Nocardia* sp. |
| *Chaetomium* sp. | *Clostridium* sp. | *Streptomyces* sp. |
| *Corprinus* sp. | *Corynebacterium* sp. | *Streotosporangium* sp. |
| *Foames* sp. | *Cytophaga* sp. | |
| *Fusarium* sp. | *Polyangium* sp. | |
| *Myrothecium* sp. | *Pseudomonas* sp. | |
| *Penicillium* sp. | *Sporocytophaga* sp. | |
| *Polyporus* sp. | *Vibrio* sp. | |
| *Rhizoctonia* sp. | | |
| *Sporotrichum* sp. | | |
| *Thielavia* sp. | | |
| *Trametes* sp. | | |
| *Trichothecium* sp. | | |
| *Trichoderma* sp. | | |
| *Verticillium* sp. | | |
| *Zygorhynchus* sp. | | |

ที่มา: ทิพวรรณ (2554)

เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่าเอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (ทิพวรรณ, 2554)

จุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก จุลินทรีย์หลายชนิดที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสมักอยู่ในกลุ่มเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสิท ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ นอกจากจะขึ้นอยู่กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ซึ่งได้แก่ อายุและปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิ การให้อากาศ และอัตราการเขย่า (ทิพวรรณ, 2554)

## 2.5 เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidic ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) ไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส(maltose) มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (Ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิราสิณี และคณะ, 2556)

### 2.5.1 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส

**2.5.1.1 แอลฟา-อะไมเลส** ($\alpha$ - amylase) มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) ชื่อเรียกตามระบบคือ $\alpha$-1,4-glucan 4-glucanohydrolase หรือ EC 3.2.1.1 มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้งเป็นโอลิโกแซกคาไรด์ และไดแซกคาไรด์ ลักษณะสำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายคือเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ภายในสายพอลิเมอร์ ผลผลิตที่ได้คือกลูแคน (glucan) และลิมิดเดกซ์ทริน (limit dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังคงมีโครงสร้างรูปเดิม ($\alpha$-configuration) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร (digestive system) ของมนุษย์ และสัตว์เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์นี้ในการไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch hydrolysis) ในขั้นตอนการทำ liquefaction เพื่อลดความหนืดของสารละลายสตาร์ช ภายหลังการเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinization) เพื่อผลิต น้ำเชื่อมกลูโคส (วิราสิณี และคณะ, 2556)

**2.5.1.2 บีตา-อะไมเลส** ($\beta$ - amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส (maltose) เอนไซม์นี้ไม่พบในน้ำย่อยของมนุษย์ แต่พบในรา (mold) แบคทีเรีย (bacteria) เช่น Bacillus cereus และพบในผลไม้ระหว่างการสุก (ripe) (วิราสิณี และคณะ, 2556)

ทั้งแอลฟา-อะไมเลส และบีตา-อะไมเลส พบในเมล็ดธัญพืช (cereal grain) เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ที่มีการเพาะให้เมล็ดธัญพืชงอก (malting) ก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ แล้วจึงนำมาเตรียมเป็นเวอร์ต (wort) ระหว่างนี้เอนไซม์อะไมเลสในข้าวมอลต์ จะไฮโดรไลซ์สตาร์ช

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(starch) หากได้ปริมาณน้ำตาลมาก เมื่อนำไปหมักจะได้แอลกอฮอล์มากด้วย เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จะทำงานที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์บีตา-อะไมเลส หากการไฮโดรไลซ์ได้เดกซ์ทรินสูง จะได้แอลกอฮอล์น้อย ถ้าอุณหภูมิต่ำบีตา-อะไมเลสจะทำงานได้ดี ได้น้ำตาลมอลโทสมากและได้เดกซ์ทรินต่ำ เมื่อนำไปหมักจะได้ แอลกอฮอล์มาก (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2546)

**2.5.1.3 แกมมา-อะไมเลส** (γ - amylase) / กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ซึ่งโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส (glucose) ผลิตได้โดยรา (mold) แบคทีเรีย (bacteria) (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2546)

## 2.6 การเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization)

การเจลลาติไนซ์ (gelatinization) คือปรากฏการณ์ของน้ำแป้งเมื่อได้รับความร้อน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในภายในโมเลกุล ของเม็ดแป้ง (starch granule) เนื่องจากความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของสตาร์ชในเม็ดแป้ง สายพอลิเมอร์ของอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ที่อัดแน่นอยู่ในเม็ดแป้งจะคลายตัวและรวมกับน้ำที่ล้อมรอบ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะปรากฏ เม็ดแป้งพองตัว และความหนืดของน้ำแป้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิที่สตาร์ชเริ่มเกิดการเจลาติไนซ์ เรียกว่า gelatinization temperature หรือ pasting temperature อยู่ในช่วงอุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ช่วงนี้เม็ดแป้งยังคงมีสภาพอยู่ได้โดยไม่แตกออก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเม็ดแป้งจะพองตัวเพิ่มขึ้นและมีความหนืดสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เกิดลักษณะของน้ำแป้งข้น (starch paste) ความหนืดจะเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดที่เม็ดแป้งเกิดการพองตัวสูงสุด และให้ความหนืดสูงสุด (maximum visicosity) จากนั้นเม็ดแป้งจะแตกถึงจุดสูงสุด ซึ่งไม่สามารถคืนสภาพได้ หรือมีการกวนอย่างรุนแรงจนเม็ดแป้งแตกออก (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2546) ซึ่งการเกิดเจลาติไนเซชันของเม็ดแป้ง แบ่งได้ 3 ระยะ คือ

**ระยะที่** 1 เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเย็นได้อย่างจำกัดและเกิดการพองตัวแบบผันกลับได้ เนื่องจากร่างแหระหว่างไมเซลล์ยืดหยุ่นได้อย่างจำกัด ความหนืดของสารแขวนลอยจะไม่เพิ่มขึ้นจนเห็นได้ชัด เม็ดแป้งยังคงรักษารูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงระนาบโพลาไรซ์ได้ เมื่อทำการเติมสารเคมีหรือเพิ่มอุณหภูมิให้สารละลายน้ำแป้ง จนถึงประมาณ 65 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่แท้จริงขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง) (พนิดา และคณะ, 2556)

**ระยะที่2** เม็ดแป้งจะพองตัวอย่างรวดเร็ว ร่างแหระหว่างไมเซลล์ภายในเม็ดแป้งจะอ่อนแอลง เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งจะดูดน้ำเข้ามามากและเกิดการพองตัวแบบผันกลับไม่ได้ เรียกว่าการเกิดเจลาติไนเซชัน เม็ดแป้งจะมีการเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างแบบที่เกิดการบิดแสงระนาบโพลาไรซ์ได้ ความหนืดของสารละลายน้ำแป้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แป้งที่ละลายได้จะเริ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายออกมาซึ่งถ้าปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสและหยดสารละลายไอโอดีนลงในส่วนใสจะเกิดสีน้ำเงินขึ้น (พนิดา และคณะ, 2556)

**ระยะที่ 3** รูปร่างเม็ดแป้งจะไม่แน่นอน การละลายของแป้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อนำไปทำให้เย็นจะเกิดเจล การเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของแป้งสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆได้ดีขึ้น รวมทั้งพร้อมที่จะถูกยอยด้วยน้ำย่อยต่างๆได้ดีกว่า (พนิดา และคณะ, 2556)

## 2.7 บิวทานอล

### 2.7.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_4H_9OH$ น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล เป็นเชื้อเพลิงชนิดหนึ่ง ถ้าเรียกว่า Biobutanol แสดงว่าได้มาจากกระบวนการหมักทางชีวภาพ (ชนิกาและคณะ, 2555) เป็นของเหลว ไม่มีสี ติดไฟได้ มีกลิ่นคล้ายกล้วย ใช้เป็นตัวทำละลายในแล็กเกอร์ ทินเนอร์ หมึกพิมพ์ กาว และใช้ในอุตสาหกรรมเคลือบผิว อุตสาหกรรมเรซิ่นมีโครงสร้างตามรูปที่ 2.8 และแสดงคุณสมบัติทางกายภาพในตารางที่ 2.2 และคุณสมบัติทางเชื้อเพลิงในตารางที่ 2.3

รูปที่ 2.8 โครงสร้างบิวทานอล

ที่มา: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.258.html (วันที่สืบค้น 26 ธันวาคม 2558)

**ตารางที่ 2.2 สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล**

| ชื่อ IUPAC | ชื่อสามัญ | สูตรโมเลกุล | จุดหลอมเหลว (°C) | จุดเดือด (°C) | ความหนาแน่น |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-butanol | n-butyl alcohol | $CH_3CH_2CH_2OH$ | -90 | 118 | 0.81 |

ที่มา: บัญชา (2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.3 สมบัติทางเชื้อเพลิงของบิวทานอล**

| ความหนาแน่นพลังงาน (MJ/L) | อัตราส่วนผสมของอากาศ และเชื้อเพลิง | ความร้อนแฝงของการระเหย (MJ/kg) | Research octane number | Motor octane number |
|---|---|---|---|---|
| 29.2 | 11.2 | 0.43 | 96 | 78 |

ที่มา: Rebel (2015)

*หมายเหตุ

Research Octane Number : RON – ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย คือค่าออกเทนที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการในสภาวะการใช้งานเบา ที่ความเร็วรอบของเครื่องยนต์ทดสอบมาตรฐาน CFR 600 รอบต่อนาที

Motor Octane Number : MON – ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ คือค่าออกเทนที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการในสภาวะการใช้งานหนัก ที่ความเร็วรอบของเครื่องยนต์ทดสอบมาตรฐาน CFR 900 รอบตอนาที

ที่มา: กระทรวงอุตสาหกรรม (2548)

**2.7.2 การผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ**

การผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพสามารถผลิตจากกระบวนการหมัก หรือที่เรียกกันว่า กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol (ABE) fermentation) เป็นกระบวนการที่รู้จักกันดี และเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นกระบวนการหมักที่ไร้ออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน และใช้เชื้อแบคทีเรียในการหมัก ส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. โดยเฉพาะ *Clostridium acetobutylicum* รวมทั้งสายพันธุ์ *C. beijerinckii* (ชนิกา และคณะ, 2555)

*Clostridium* spp. พบว่านอกจากจะมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลแล้ว ยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ อะซิโทนและเอทานอลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบิวทานอล โดยให้ผลผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพแล้ว การหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลวเป็นหนึ่งในงานวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางแถบยุโรปซึ่งมีการทำงานสะสมองค์ความรู้ทางด้านนี้มานานแล้ว กระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงเหลวเป็นหรือกระบวนการ ABE Fermentation ซึ่งมีตั้งแต่ 0.9 จนถึงสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร และความสามารถในการผลิต คือ 0.04 จนถึง 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความสามารถในการผลิต ABE ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชีวมวลที่ใช้ อุณหภูมิ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เป็นต้น อย่างไรก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาม หากจะเน้นความสนใจไปที่กระบวนการผลิตแล้ว ความสามารถในการผลิตสารทำละลายต่างๆ ยังอยู่ในปริมาณจำกัดอยู่ เนื่องจากโดยหลักการแล้วความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่เกิดความเป็นพิษและเมื่อเซลล์มีการสะสมสารพิษเหล่านั้นจนมากพอ เซลล์จะหยุดการเจริญและตายในที่สุด ปัญหาเหล่านี้เป็นผลมาจากการขาดความทนทานต่อผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายที่จุลินทรีย์หมักและผลิตขึ้นทำให้การผลิตด้วยวิธีนี้ไม่สามารถแข่งขันได้กับวิธีการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีได้ แต่เนื่องจากการใช้น้ำมันปิโตรเลียมที่สูงขึ้น ราคาที่พุ่งขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อทดแทนบางส่วนของการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งทั่วโลก เมื่อเปรียบเทียบเชื้อเพลิงทดแทนทั้งหมดแล้ว ไบโอบิวทานอลจึงมีบทบาทสำคัญในยุคต่อไปของเชื้อเพลิงชีวภาพ โดยที่การผลิตอะซิโทนและบิวทานอลจากการหมักของจุลินทรีย์ในสกุลนี้จากของเสียจำพวกสารชีวภาพทางการเกษตร เช่น เศษไม้ ซังข้าวโพด ฟางข้าว และกากชานอ้อย กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในโรงงานต่างๆ ในยุโรปและอเมริกา เนื่องจากการผลิตสารละลายอินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพจากการใช้จุลินทรีย์หมักสารชีวมวลเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ปัจจุบันบิวทานอลเป็นสารเคมีที่สำคัญที่ผลิตได้ประมาณ 5-10 ล้านตัน และถูกคาดการณ์ในอนาคตไว้ว่า อัตราการเพิ่มการผลิตบิวทานอลจะสูงขึ้นถึง 3 เปอร์เซ็นต์ต่อปี ใน 5 ปีข้างหน้า (ชนิกาและคณะ, 2555)

**2.7.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักในการผลิตบิวทานอล**

**2.7.4.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น**

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยส่วนมากหากความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลน้อยกว่า 20 กรัมต่อลิตร ผลผลิตที่ได้มักจะน้อย ถ้าหากความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มของน้ำตาลอยู่ที่ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะมากกว่า แต่หากความเข้มข้นสูงมากกว่า 80 กรัมต่อลิตร น้ำตาลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นจะไม่เกิดการหมัก เนื่องจากเกิดการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ หรือ Product inhibition และถ้าความเข้มข้นสูงไปถึง 120 กรัมต่อลิตร จะเกิดการยับยั้งของสารตั้งต้น หรือ Substrate inhibition ซึ่งจะสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้เพียงเล็กน้อย

2.7.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลอย่างมากต่ออัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักนั้นอยู่ในช่วง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น จะทำให้อัตราการผลิตน้อยลดลง

**2.7.3.3 ออกซิเจน**

เชื้อ *C. acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Obligate anaerobe) แต่จะไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) เนื่องจากการสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากนั้นจะทำให้การใช้น้ำตาลกลูโคสลดลง การเจริญ การสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีนจะหยุดชะงัก ส่งผลให้ไม่สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ แต่จะไม่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายหากเชื้ออยู่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน แล้วได้รับการสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณน้อย ระยะเวลาสั้นๆ

**2.7.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)**

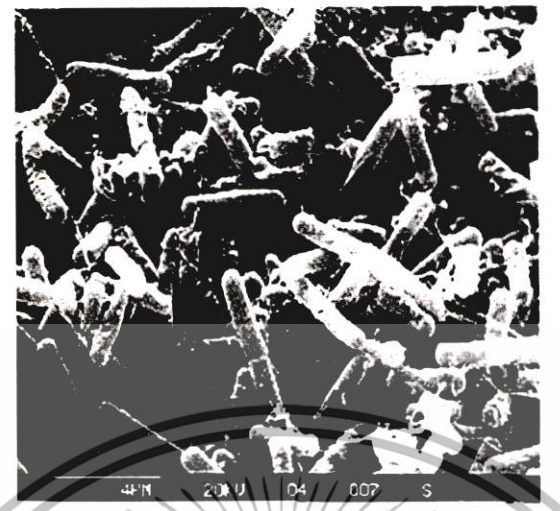
ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นตัวกำหนดการย่อยสลายน้ำตาล โดยค่า pH ที่เหมาะนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมัก โดยช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์มักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 (สุนทรและอภิชัย, 2555)

**2.7.4 การนำบิวทานอลมาใช้ประโยชน์**

บิวทานอลสามารถที่จะนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์ เครื่องยนต์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนคุณสมบัติอื่นๆ ซึ่งเป็นจุดเด่นและสำคัญของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ค่าพลังงานของบิวทานอลยังมีค่าที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธิ์ ซึ่งสูงกว่าเอทานอล และสามารถผสมกับแก๊สโซลีนได้ในอัตราส่วนต่างๆ ในขณะที่เอทานอลนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้เพียงบางส่วนเท่านั้น โดยต้องใช้ปริมาณที่มากกว่าจึงจะได้พลังงานที่เท่ากับบิวทานอล และบิวทานอลยังมีคุณสมบัติที่เหนือกว่าเอทานอลในด้านการระเหยกลายเป็นไอได้ต่ำกว่า การกัดกร่อนต่ำ ทำให้บิวทานอลมีความปลอดภัยในการลำเลียงขนส่ง ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลยังมีความดันไอต่ำ มีค่าออกเทนสูง ทำให้สามารถผสมกับน้ำมันดีเซลและแก๊สโซลีนได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เอทานอลมีความดันไอที่สูงจึงทำให้ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน และบิวทานอลยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเอทานอลทั้งความหนาแน่นและความจุความร้อนอีกด้วย (สุนทรและอภิชัย, 2555) นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิลอะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสี ไม่เพียงเท่านี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำ ละลายสำหรับสารเคลือบไม้และวัสดุต่างๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid Curable Lacquers และ Baking Finish) การใช้ประโยชน์จากบิวทานอลและสารประกอบอื่นๆ คือ เป็นทินเนอร์ สำหรับผสมสี (Paint Thinner) เป็นตัวทำละลายในสี (Solvent for Dyes) เช่น หมึกปริ้นท์ และเป็นสารสกัดในกระบวน การผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ฮอร์โมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น กระจกนิรภัย (Safety Glass) สารทำความสะอาด (Detergents) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย เป็นสารสำหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่น (ชนิกาและคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 *Clostridium acetobutylicum*



**รูปที่ 2.9** รูปร่างลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* sp.
ที่มา: http://bacmap.wishartlab.com/organisms/26 (วันที่สืบค้น 1 ธันวาคม 2558)

*Clostridium* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการหมักโดยลดต้นทุนในการใช้ใบพัดเพื่อให้อากาศ เนื่องจากปกติแล้วค่าดำเนินการเกี่ยวกับใบพัดในถังหมักจะเป็นครึ่งหนึ่งของราคาถังหมัก แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรีย แกรมบวกมีรูปร่างเป็นท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี สามารถพบได้ในรูปสปอร์กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลสแป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล การคัดเลือกและคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตบิวทานอลจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในกระบวนการหมักด้วย (ชนิกาและคณะ, 2555) โดยสายพันธุ์ที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือ *Clostridium acetobutylicum* sp. และ *C. beijerinckii* sp. ซึ่งสามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดไปเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ได้ โดยกระบวนการหมักเอบีอี (ABE fermentation) (สุนทรและอภิชัย, 2555)

### 2.8.1 อนุกรมวิธาน

| | | |
|---|---|---|
| Kingdom | : | Bacteria |
| Division | : | Firmicutes |
| Class | : | Clostridia |
| Order | : | Clostridiales |
| Family | : | Clostridiaceae |
| Genus | : | *Clostridium* |
| Species | : | *Clostridium acetobutylicum* |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.8.2 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา**

แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* เป็นเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ย้อมสีติดแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods shape) มีแฟลกเจลลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่รอบๆเซลล์ สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ มีตำแหน่งค่อนไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 μm โคโลนีมีลักษณะเป็นสีครีมผิวเป็นมันและโปร่งแสง แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* มีวงจรชีวิต 4 รูปแบบ ดังต่อไปนี้

(1) การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน อาจพบในลักษณะเป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรือเป็นคู่ (Pair) หรือเรียงกันเป็นสายยาว

(2) รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์มีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ (Cigar-shape) ในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้าง Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เกิดการพองตัวขึ้น

(3) โฟร์สปอร์ (Forespores) เซลล์จะมีการสร้างโฟร์สปอร์ขึ้นเมื่อเกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และหลังจากนั้นโฟร์สปอร์จะเจริญต่อไป

(4) สปอร์ (Spore) เซลล์สร้างสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (สุนทรและอภิชัย, 2555)

**รูปที่ 2.10** วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* sp.

ที่มา: http://www.responsiblebusiness.eu/display/rebwp7/Microorganisms+for+ABE+fermentation (วันที่สืบค้น 15 กันยายน 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

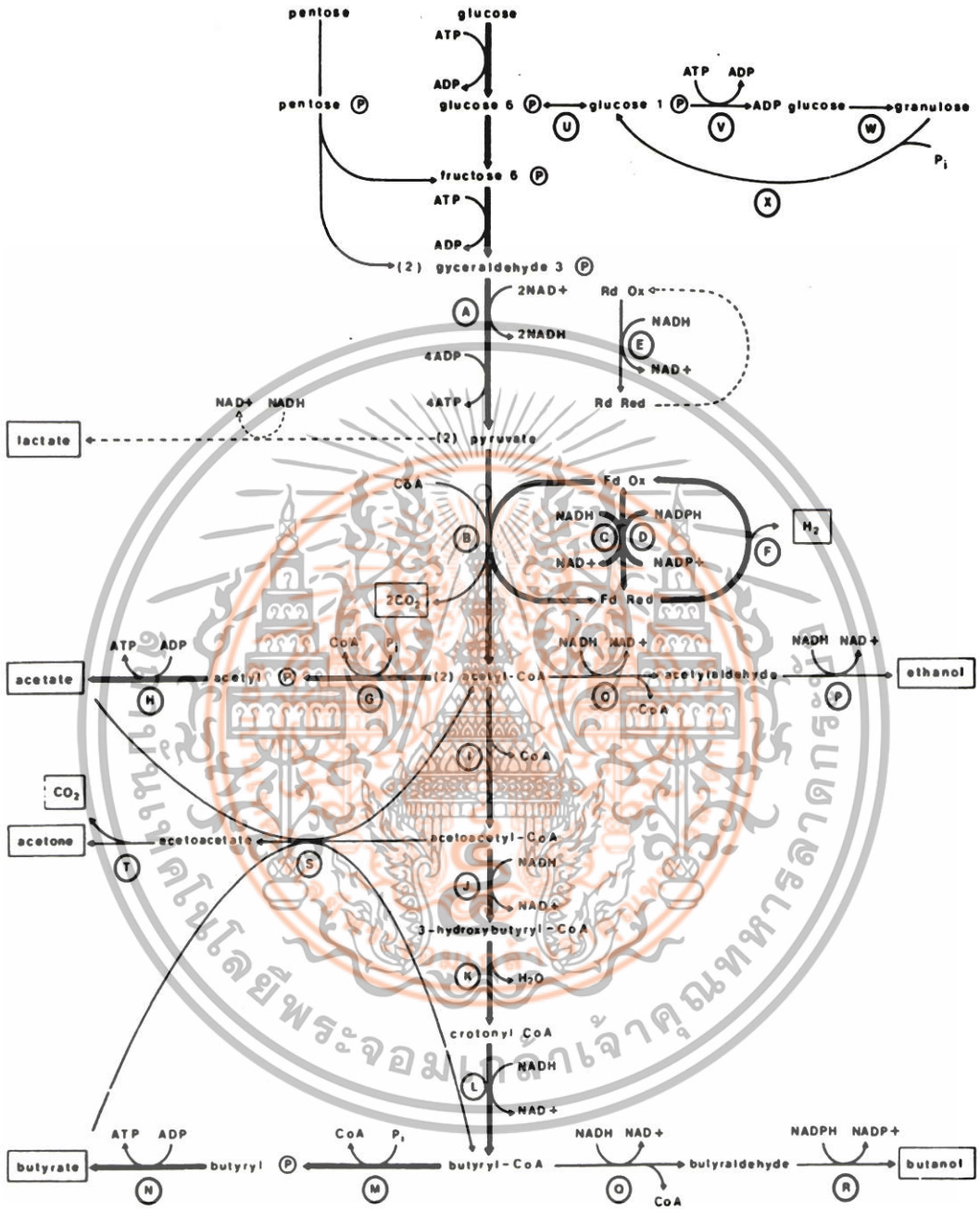
โดยจะมีรูปแบบการหมักแบบแบทช์แบ่งเป็น 2 ระยะที่แตกต่างกัน คือ ในระยะแรก จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ อันได้แก่ กรดบิวทิริก และกรดอะซิติกในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ลดลง มักเรียกช่วงนี้ว่า ช่วงของการผลิตกรดอินทีย์ หรือ Acidogenesis หลังจากนั้นในระยะที่สอง ซึ่งเป็นช่วงของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อันได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นภายหลังการหมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ในช่วงนี้ค่า pH ของจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นบางส่วน ซึ่งระยะนี้มักเรียกว่าระยะการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenesis นอกจากนี้ ในระหว่างกระบวนการหมัก ยังมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาตลอดกระบวนการด้วย (สุนทรและอภิชัย, 2555)

**2.8.3 คุณสมบัติทางชีวเคมี**

แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. มีวิถีทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน ดังที่แสดงในรูปที่ 2.11 โดยน้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ NADH + $H^+$ จำนวน 2 โมเลกุล ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มี Coenzyme A (CoA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก ซึ่งจะทำให้ค่า pH มีค่าลดลง นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้เป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับไม่ได้ กลไกการผลิตอะซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง $NAD^+$ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง $NAD^+$ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH + $H^+$ ถึง 2 โมเลกุล เพื่อสร้าง $NAD^+$ (สุนทรและอภิชัย, 2555)




**รูปที่ 2.11** วิถีทางชีวเคมีของ *Clostridium acetobutylicum* ลูกศรชนิดหนาแสดงปฏิกิริยาในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ลูกศรชนิดบางแสดงปฏิกิริยาในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

ที่มา: สุนทรและอภิชัย (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร:** (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH-ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase) ; (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA: acetate/butyrate: CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase.

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กฤษฎา และชุติมณฑน์ (2557) ได้ทำการวิจัยการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากเหง้ามันสำปะหลังที่ย่อยโดย *Clostridium saccharobutylicum* BAA 117 เหง้ามันสำปะหลัง เป็นผลพลอยได้จากต้นมันสำปะหลัง ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ได้ศึกษาการปรับสภาพด้วยความร้อนและการปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับภาวะด่าง การปรับสภาพด้วยความร้อนร่วมกับภาวะด่างกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส มากกว่า การปรับสภาพด้วยความร้อน การปรับสภาพซับสเตรทด้วยความร้อนร่วมกับภาวะด่างแสดงให้เห็นว่าได้เซลลูโลสสูงสุด 81.02 เปอร์เซ็นต์ และย่อยด้วยเอนไซม์สำเร็จรูป (Celluclast 2 ลิตร และ Novozym 188) ได้ทำการทดสอบผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น (0.75 เปอร์เซ็นต์ ถึง 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และปริมาณเอนไซม์ (20 ถึง 30 U ต่อกรัมสารตั้งต้น) ความเข้มข้นสูงสุดของน้ำตาลรีดิวซ์จากซับสเตรทที่ปรับสภาพแล้ว (9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และการย่อยด้วยเอนไซม์ (50 องศาเซลเซียส pH 4.8, 48 ชั่วโมง) โดยใช้เอนไซม์สำเร็จรูป 30 unit ต่อกรัมซับสเตรท ได้เท่ากับ 72.26 ± 2.11 กรัมต่อลิตร (ผลได้เท่ากับ 89.03 เปอร์เซ็นต์) การย่อยเหง้ามันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) โดยเชื้อ *Clostridium saccharobutylicum* ในการหมักแบบแบทช์ ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตตัวทำละลายที่ทดสอบในช่วง 40~70 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับผลของค่า pH ที่แตกต่างกัน (pH 4.5-6.0) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อ *C. saccharobutylicum* BA 117 ให้ผลผลิตตัวทำละลายจากการย่อยเหง้ามันสำปะหลัง ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ABE คือ 5.5 เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อผลิต ABE เพียง 7.29 กรัมต่อลิตร จากการย่อยที่ไม่ได้(เก็บรักษา/ปรับสภาพ)ด้วย polymeric adsorbent resin การหมักกับการกำจัดตัวยับยั้ง ผลในการผลิต ABE คือ 10.57 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสที่ได้ ABE เท่ากับ 13.37 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณัฐพงษ์ และเศรษฐวัชร (2558) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ โดยในขั้นตอนการศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกัน คือ เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อยกากมันสำปะหลังสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งได้ผลเหมือนกันกับการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อย เมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในการย่อยกากมันสำปะหลังพบว่า สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูง โดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส ตามลำดับ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 82.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสที่ย่อยเม็ดแป้งที่เกาะอยู่บริเวณนอกเส้นใยของกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่ง และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ย่อยเส้นใยเซลลูโลส ทำให้เม็ดแป้งที่อยู่ด้านในเส้นใยหลุดออก เป็นผลให้แป้งถูกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยกลายเป็นน้ำตาลได้อีก

วัชระ และเบญจมาศ (2554) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE) จากกากเยื่อใยปาล์มจากอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของเชื้อ *Clostridium* sp.และ *Bacillus* sp. โดยทำการปรับสภาพกากเยื่อใยปาล์ม (PPF) โดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที หรือใช้ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตรของกรดซัลฟิวริก ($H_2SO_4$) และนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที PPF ที่เหลือหลังจากการปรับสภาพด้วย NaOH, $H_2SO_4$ และทั้ง NaOH กับ $H_2SO_4$ ได้เท่ากับ 63.28, 62.20 และ 47.00 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักตามลำดับ การปรับสภาพทั้ง NaOH และ $H_2SO_4$ ได้ปริมาณลิกนินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และได้เซลลูโลสสูงสุด 76.32 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การผลิต ABE โดยใช้ PPF ที่ปรับสภาพ เป็นแห่งคาร์บอน ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียว สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 1713 และอาหารเลี้ยงเชื้อผสมของ *C. acetobutylicum* DSM 1713 กับ *Bacillus cellulolyticus* JCM 9156 ที่มีและไม่มีการเติมเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวและอาหารเลี้ยงเชื้อผสม ที่เติมเอนไซม์เซลลูเลส 30 U ให้ผลผลิต ABE เท่ากับ 3.97 และ 3.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ 144 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเอนไซม์เซลลูเลส ผลิต ABE ได้น้อยมาก (0.25-0.49 กรัมต่อลิตร) แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อผสมไม่ได้ให้ผลผลิต ABE มากขึ้น มันอาจลดการใช้ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) และแก๊สไนโตรเจนเพื่อให้แน่ใจว่าอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ABE จากอาหารเลี้ยงเชื้อผสมที่ใช้ PPF ที่ปรับสภาพ 5.0 กรัมต่อลิตร และโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือ (ISP) 9.0 กรัมต่อลิตร ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที และเติมเอนไซม์เซลลูเลส 30 U ในสภาวะนี้ผลิต ABE ได้ 4.95 กรัมต่อลิตร ที่ 144 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุขฤดี อัศวศักดิ์สกุล (2547) ได้ศึกษาสมบัติของสตาร์ชที่สกัดจากเผือกหอม *Colocasia esculenta* (L.) Schott จากการศึกษาพบว่า องค์ประกอบโดยน้ำหนักแห้งของเผือกหอมคือ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 83.1-91.7, ไขมันร้อยละ 0.3-0.9, โปรตีนร้อยละ 4.2-9.3, ใยอาหารร้อยละ 1.1-3.5, เถ้าร้อยละ 2.0-5.1 และมีแคลเซียมออกซาเลต 284.8-456.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง การสกัดโปรตีนออกโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ให้ปริมาณโปรตีนในสตาร์ชเผือกต่ำกว่าการสกัดโดยใช้น้ำ เมื่อนำเผือกแห้งมาผลิตเป็นสตาร์ชได้ปริมาณผลผลิต ร้อยละ 28.0-53.2 ที่แหล่งปลูกเดียวกันสตาร์ชที่สกัดจากหัวเผือกขนาดต่างกันมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างกัน ในขณะที่สตาร์ชที่สกัดจากเผือกที่มาจากแหล่งปลูกต่างกันมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน โดยสตาร์ชเผือกหอมมีองค์ประกอบโดยน้ำหนักแห้งคือ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 96.9-98.2 โปรตีนร้อยละ 0.7-1.9 ไขมันร้อยละ 0.1-0.3 ใยอาหารร้อยละ 0.1-0.9 เถ้าร้อยละ 0.1-0.3 และมีแคลเซียมออกซาเลต 182.0-200.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง สตาร์ชเผือกมีปริมาณอะไมโลสร้อยละ 18.8-22.4 โดยมีค่า degree of polymerization เฉลี่ยของสายอะไมโลสในสตาร์ชที่สกัดจากเผือกขนาดเล็กอยู่ในช่วง 195-238 สำหรับโครงสร้างของอะไมโลเพคติน พบว่ามีความยาวสายเฉลี่ย 21.5-31.7 ไมโครเมตร ค่า % Beta amylolysis 43.1-53.1 ความยาวสายภายนอกเฉลี่ย 12.6-16.9 ไมโครเมตร และความยาวสายภายในเฉลี่ย 7.1-14.6 ไมโครเมตร สตาร์ชเผือกมีรูปร่างหลายเหลี่ยมและขนาดไม่สม่ำเสมอ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดสตาร์ชอยู่ในช่วง 1.3-2.2 ไมโครเมตร โครงร่างผลึกเป็นแบบ A มีค่ากำลังการพองตัวและการละลายต่ำคือ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่า 11.0-17.4 กรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งสตาร์ชและ 8.1-13.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สตาร์ชเผือกเกิดเจลาติไนซ์ที่ onset temperature 64.80-77.32 องศาเซลเซียส, peak temperature 72.20-83.46 องศาเซลเซียส และ conclusion temperature 82.75-91.00 องศาเซลเซียส โดยมี peak viscosity อยู่ในช่วง 264-441 RVU. เมื่อเก็บแป้งเปียกของสตาร์ชเผือกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน พบว่าแป้งเปียกมี % retrogradation เท่ากับ 36.0-38.7 และ 40.7-46.6 ตามลำดับ การเพิ่ม pH จาก 3.5 เป็น 6.5 พบว่า peak viscosity ของแป้งเปียกเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.6 แป้งเปียกของสตาร์ชเผือกที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลายรอบแรกแล้วมีลักษณะโครงสร้างคล้ายฟองน้ำ (sponge-like structure)

Kai และLars (2014) ศึกษาการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากการย่อยสลายซังข้าวโพดด้วยเชื้อ *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 โดยทำการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วย 0.5 โมลต่อลิตร NaOH และย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ค่าผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์ คือ 917 กรัมต่อกิโลกรัม ปรับสภาพและล้างน้ำซังข้าวโพด โดยการไฮโดไลซ์โดยไม่ได้กำจัดตะกอน ผลผลิตตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 19.44 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 12.27 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ 55.22 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ของ ABE คือ 350 กรัมต่อกิโลกรัม อัตราการผลิตคือ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ชุดควบคุม ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ผสม 55.3 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้คือ ผลผลิต ABE อยู่ที่ 16.81 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอล 10.26 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าผลได้ของ ABE คือ 300 กรัมต่อกิโลกรัม และอัตราการผลิตอยู่ที่ 0.47 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า การย่อยด้วยเอนไซม์กระตุ้นให้เกิดกระบวนการหมัก ABE เพิ่มขึ้นได้

Kiyoshi และคณะ (2015) ได้ทำการทดลอง การผลิตบิวทานอลจากการปรับสภาพฟางข้าวด้วยด่าง โดยเลี้ยงเชื้อ *Clostridium thermocellum* ร่วมกับ *Clostridium saccharoperbutylaceto-nicum* การเลี้ยงเชื้อร่วม (co-culture) เพื่อย่อยสลายเซลลูโลส โดยเชื้อ *Clostridium thermocellum* NBRC 103400 และ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* สายพันธุ์ N1-4 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 5.5 กรัมต่อลิตร จากฟางข้าวที่ไม่ผ่านการกำจัดลิกนิน 40 กรัมต่อลิตร ที่ปรับสภาพด้วย 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของ NaOH เมื่อเติมเอนไซม์เซลลูเลส (100 U ต่อกรัมชีวมวล) เข้าไปในระบบ และใช้ฟางข้าวที่ไม่ผ่านการกำจัดลิกนิน 40 กรัมต่อลิตร ทำให้การผลิตบิวทานอลเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 6.9 กรัมต่อลิตร และนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การผลิตบิวทานอลที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสในตัวอย่าง จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน กับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เอกโซกลูคาเนส ทำให้การผลิตบิวทานอลจากฟางข้าวที่ไม่ผ่านการกำจัดลิกนินมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

Piyoungkoon และ Benjamas (2011) ได้ศึกษาเพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพคือ ไบโอบิวทานอลจากทะลายปาล์ม โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ทำการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* สำหรับการย่อยสลายด้วยกรดจะได้น้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วง 0-2.0 เปอร์เซ็นต์ การเพิ่มความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกในช่วง 0.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลลดลง เป็น 44-49 กรัมต่อลิตร ก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีการปรับสภาพทะลายปาล์มก่อนด้วยกรด เบส หรือทั้งสองอย่าง โดยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพิ่มขึ้นจาก 41.32 ± 0.81 เปอร์เซ็นต์ ถึง 62.97 ± 0.32, 62.70 ± 0.35 และ 68.40 ± 0.89 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับสภาพก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสด้วยกรดหรือเบสหรือทั้งสองอย่าง ดังนั้น การปรับสภาพทะลายปาล์มก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพทะลายปาล์มด้วยกรด เบส หรือทั้งกรดและเบสเป็น 10.14 ± 0.14, 16.43 ± 0.40 และ 6.50 ± 0.23 กรัมต่อลิตรตามลำดับ พบว่าการปรับสภาพทะลายปาล์มด้วยเบสเป็นวิธีการที่ดีที่สุดก่อนก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ การผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร RCM ที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ที่ย่อยทะลายปาล์มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ทั้งหมดคือ 1.262 ± 0.218 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการย่อยสลายทะลายปาล์มด้วยกรดซัลฟูริก คือ 1.058 ± 0.173 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินงาน

## 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

### 3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ คือ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยเก็บกล้าเชื้อในอาหาร Difco™ Reinforced Clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

### 3.1.2 สารเคมี

| | |
|---|---|
| กลูโคส | คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ | ปิโตรเลียมอีเทอร์ |
| สารละลายกรดซัลฟิวริก | ไฮโดรคลอริก |
| อะซิโตน | กรดบอริกเข้มข้น |
| สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน | ไซโลส |
| เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate) | อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) |
| เอทธิลแอลกอฮอล์ | เซลล์สูไบโอส |
| 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) | กลีเซอรอล |
| กรีนเมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ | ซิตริก |
| potassium hydrogenphthalate | บิวทิริก |
| เอทานอล | บิวทานอล |
| เอนไซม์ ACCELLERASE15000. | อะซิติก |
| รีซาซูลิน (Resazurin) | ผงวุ้น (Agar) |
| Nutrient broth | มอลโตส |

### 3.1.3 อุปกรณ์

| | |
|---|---|
| ขวดรูปชมพู่ | water bath |
| ปั๊มดูดอากาศ | ตะเกียงบุนเซ็น |
| ตู้อบลมร้อน | ไฟแช็ค |
| เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ | แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อ |
| ถ้วยอลูมิเนียม | กรวยกรองบุชเนอร์ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| คีมหนีบ | กระดาษกรอง |
| Suction flask | บีกเกอร์ |
| แผ่นดูดออกซิเจน (Anaerobiccult A) | ลูกยางดูดสาร |
| Anaerobic jar | ปิเปต |
| ออโต้ปิเปตต์ | ตระแกรงร่อน |
| จานเพาะเลี้ยงเชื้อ | ตู้เย็น |
| แท่งแก้วคนสาร | ลูปเขี่ยเชื้อ |
| คิวเวต | Anaerobic chamber |
| หลอดทดลองหลอดปั่นเหวี่ยง | เครื่องปั่นเหวี่ยง |
| เครื่องเขย่าสาร (Vortex) | ถังก๊าซไนโตรเจนและก๊าซผสม |
| ตู้ปลอดเชื้อ | กระบอกตวง |
| เครื่องโซนิเคเตอร์ | ขวดปรับปริมาตร |
| พีเอชมีเตอร์ | ตู้ดูดควัน |
| กระดาษวัด pH | เครื่องชั่งสาร |
| น้ำกลั่น | จุกสำลี |
| ช้อนตักสาร | เครื่องบด Retsch รุ่น SK100 |
| เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ) | |
| สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) | |

## 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM)

เป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาหัวเชื้อของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 มีส่วนประกอบ ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) | 3.0 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| เปปโตน | 10.0 | กรัมต่อลิตร |
| กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl) | 0.5 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 5.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate) | 3.0 | กรัมต่อลิตร |
| ผงวุ้น | 0.5 | กรัมต่อลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยละลายส่วนผสมปริมาณ 38 กรัม เข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และทำการปรับปริมาตรของอาหาร RCM ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**3.2.2 อาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine ; GYCC)**

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Badr และคณะ (2000) ซึ่งมีส่วนผสม ดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| น้ำตาลกลูโคส | 50.0 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดจากยีสต์ | 5.0 | กรัมต่อลิตร |
| เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate) | 15.0 | กรัมต่อลิตร |
| กรดอะมิโนซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl) | 0.5 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) | 1.0 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 2.5 | กรัมต่อลิตร |
| เรซาซูลิน (Resazurin) | 0.001 | กรัมต่อลิตร |

โดยละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรของอาหาร GYCC ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลแยกสารส่วนประกอบอาหารอื่นๆ และหากใช้ชานอ้อยเป็นสารตั้งต้น จะใช้สารที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

ทำชุดควบคุมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งและไม่มีออกซิเจน ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตร

## 3.3 วัตถุดิบ

### 3.3.1 เปลือกเผือก

ได้รับความอนุเคราะห์เปลือกเผือกจาก บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด (มหาชน) นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร และร้านลูกยายทัย หมู่บ้านเศรษฐกิจ บางแค กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.2 การเตรียมเปลือกเผือก

เตรียมโดยอบเปลือกเผือกที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด ยี่ห้อ Retsch รุ่น SK 100 จากนั้นนำเปลือกเผือกที่ผ่านการบดแล้วมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร และแบ่งตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ องค์ประกอบของเปลือกเผือก ศึกษาการปรับสภาพเปลือกเผือก การย่อยด้วยเอนไซม์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

## 3.4 กระบวนการปรับสภาพเปลือกเผือก

### 3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

นำตัวอย่างมาทำการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วย autoclaves ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำส่วนใสไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) ส่วนของแข็งนำไปปรับพีเอชโดยทำการล้างน้ำกลั่น จนกว่าพีเอชของน้ำล้างเป็นกลาง

### 3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

นำตัวอย่างมาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วย autoclaves ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำส่วนใสไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) ส่วนของแข็งนำไปปรับพีเอชโดยทำการล้างน้ำกลั่นจนกว่าพีเอชน้ำล้างเป็นกลาง

### 3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำตัวอย่างมาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วย autoclaves ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman No.1 และนำส่วนใสและนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) ส่วนของแข็งนำไปปรับพีเอชโดยทำการล้างน้ำกลั่น จนกว่าพีเอชน้ำล้างเป็นกลาง

## 3.5 กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์

### 3.5.1 การย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 1.00 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเปลือกเผือกที่ปรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพด้วยเบส กรด น้ำ และทำการปรับพีเอชให้เป็น 5.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างของแข็งแห้ง 1 กรัม บ่มใน water bath 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid)

**3.5.2 การย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส**

นำเปลือกเผือกที่เตรียมจากหัวข้อ3.3.2 15 กรัมมาละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดดูแรน ขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด (gelatinize) โดยให้ความร้อนเป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์เอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05 ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 0.015 ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตร บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ให้ได้ส่วนใสไม่มีตะกอน แล้วทำการเก็บตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) ตามหัวข้อ 3.7.3.1

**3.5.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ผสม**

นำเปลือกเผือกที่บดแล้วขนาด 300 ไมครอน 15 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด (gelatinize) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นจากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส แล้วใส่เอนไซม์ เอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05 ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 0.015 ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตร และเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาตร 0.2 นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

## 3.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก

**3.6.1 ปริมาณเปลือกเผือก**

นำเปลือกเผือก ปริมาณ 10 กรัม, 15 กรัม และ 20 กรัม นำเปลือกเผือกปริมาณปริมาณต่างๆมาผสมกับน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด (gelatinize) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นทำตามวิธีที่ 3.7

**3.6.2 ปริมาณเอนไซม์ ACCELLERASE1500**

นำเปลือกเผือกบดปริมาณที่ดีที่สุดจาก หัวข้อ 3.6.1 น้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด (gelatinize) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วใส่เอนไซม์ เอลฟาอะไมเลสสร้อยละ 0.05 ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อนละ 0.015 ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตร และเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**3.6.3 การใช้น้ำและบัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์**

ทำการเตรียมเอนไซม์อะไมเลสด้วยน้ำกลั่นและเตรียมเอนไซม์อะไมเลสด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ จากนั้นนำเปลือกเผือกที่บดแล้วขนาด 300 ไมครอน 15 กรัม และน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด (gelatinize) เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นจากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส แล้วใส่เอนไซม์ เอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05 ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสร้อยละ 0.015 ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตร และเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาตร 0.2 นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) รายละเอียดดังแสดงในหัวข้อ 3.7.3.1

## 3.7 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

**3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ**

การเตรียมหัวเชื้อโดยทำการถ่ายเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เก็บในอาหารเหลว RCM ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว RCM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยนำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ที่ได้ต่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

**3.7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ**

ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.7.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร GYCC ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์จากเปลือกเผือกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยของแข็งด้วยเอนไซม์ในหัวข้อที่ 3.5.3 รายละเอียดอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์(Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 โดยแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 7 มิลลิลิตร แยกใส่หลอดเซนตริฟิว 2 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ความเป็นกรด – ด่าง ด้วยเครื่องวัด pH (pH meter) ยี่ห้อ Clean รุ่น PH500 หลังจากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) วิเคราะห์หาปริมาณ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ) โดยนำไปเทียบกับชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เสร็จแล้วเติมอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเติมอาหารใส่ลงในขวดรูปชมพูทั้ง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 7 มิลลิลิตร เพื่อปรับให้ปริมาตรอาหารเท่าเดิม

## 3.8 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเปลือกเผือกและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บมาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในหัวข้อ 3.7 ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

### 3.8.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate analysis)

#### 3.8.1.1 ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

นำถ้วยอบตัวอย่างพร้อมฝาอบเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 2 กรัมใส่ในถ้วยอบ บันทึกน้ำหนัก ปิดฝาถ้วย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ขณะอบเปิดฝาถ้วยออก เมื่อครบกำหนดเวลา นำถ้วยออกใส่ในโถดูดความชื้นและปิดฝาถ้วยแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก

**การคำนวณ**

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_3} \times 100$$

$W_1$ คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

$W_2$ คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

$W_3$ คือ น้ำหนักตัวอย่าง

#### 3.8.1.2 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

**การย่อยตัวอย่าง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) เติมคะตะลิสต์ลงไป 1 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 20-25 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shild สวม exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอดย่อย ตั้งstand หลอดย่อยและexhaust ลงบนเครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส ย่อยในตู้ดูดควันทำการย่อยจนสารละลายใสมีสีเขียวอ่อนหรือฟ้า ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออกปล่อยให้เย็นเพื่อรอนำไปกลั่น

**การกลั่น**

เปิด Power เครื่องหล่อเย็น จากนั้นเปิดเครื่องกลั่นแล้วตั้งระบบการทำงานของเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยน้ำกลั่น ตวงสารละลายบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ นำหลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น และวางขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกไว้บริเวณ Platefrom ให้แท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก ปิด Safety door ทำการกลั่นเป็นเวลา 4 นาที เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่ และหลอดย่อยออกจากเครื่อง

**ขั้นตอนการไตเตรท**

นำสารละลายในขวดขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับสารละลายซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 N จนได้สารละลายเป็นสีชมพูอ่อน

**คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้**

$$\%\text{ไนโตรเจน} = \frac{\left(\text{ปริมาตรของ}H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรต} - \text{ปริมาตรของ}H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรทBlank}\right)\times 0.1 \times 0.014}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

$$\%\text{โปรตีน} = \%\text{ไนโตรเจน} \times 6.25 \text{ (conversion factor)}$$

3.8.1.3 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

นำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างมา 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิ้ล เปิดเครื่องสกัดและเครื่องทำความเย็นนำทิมเบิ้ลที่มีตัวอย่างวางลงในที่ใส่ทิมเบิ้ล จากนั้นนำเข้าเครื่องสกัดไขมัน ตวงปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตรเกินพอ ทำการสกัด ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ในฟลาสก์สกัดไขมันที่เหลือใส่บีกเกอร์ที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์เหลือแต่ไขมันที่สกัดได้ นำออกมาใส่โถดูดความชื้นรอจนเย็นจากนั้น นำบีกเกอร์ไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำไปคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

**คำนวณ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(W_3-W_2)}{W_1} \times 100$$

$W_1$ = น้ำหนักตัวอย่าง

$W_2$ = น้ำหนักบีกเกอร์

$W_3$ = น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมัน

**3.8.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)**

นำครูซิเบิ้ลแก้วสำหรับวิเคราะห์เยื่อใยไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนักไว้ นำตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ความชื้นและสกัดไขมันแล้วใส่ลงไปในครูซิเบิ้ลที่ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ประมาณ 1 กรัม วางครูซิเบิ้ลแก้วลงในหลุมที่อยู่บนตัวเครื่องมือสกัดเส้นใยเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้วเทลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นาน 30 นาที กรองเอาสารละลายออก (เปิดลิ้นไปที่ vacuum) ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร (ในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดลิ้นไปที่ pressure เพื่อให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้วทำให้ส่วนผสมของถ้วยแก้วคลุกเคล้ากันโดยตลอด) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนลงไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นาน 30 นาที กรองเอาสารละลายด่างออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยอะซิโตนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง จะได้ นำกากที่ได้ไปอบต่อที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งและบันทึกน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

**การคำนวณ**

$$\% \text{ เยื่อใยหยาบ} = \frac{(F_1-F_2)}{F_3} \times 100$$

$F_1$ = น้ำหนักของเยื่อใยหยาบรวมกับน้ำหนักเถ้า

$F_2$= น้ำหนักที่ได้จะเป็นน้ำหนักเถ้า

$F_3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

**3.8.1.5 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)**

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์เยื่อใยหยาบแล้วนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รออุณหภูมิลดจนเหลือต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้ถ้วยสัมผัสกับอากาศเย็นกะทันหันซึ่งอาจทำให้ถ้วยแตกได้ นำครูซิเบิ้ลออกใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นนำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก แล้วคำนวณตามสมการ

**การคำนวณ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักครูซิเบิ้ลพร้อมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักครูซิเบิ้ล}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

**3.8.2 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน** (ส่งวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

**3.7.2.1 ปริมาณเซลลูโลส (Van และคณะ, 1991)**

**หาปริมาณเซลลูโลส โดยวิธี Detergent analysis วิเคราะห์หาได้โดย ผลต่างระหว่าง** ADF และ ADL

**วิธีวิเคราะห์หา** Acid Detergent Fiber (ADF)

นำครูซิเบิ้ลขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก จากนั้นชั่งตัวอย่างที่แห้งบดละเอียด ขนาด 300 ไมโครเมตร ใส่ในบีกเกอร์ปากกลมเรียบ แล้วนำสารละลาย Acid Detergent ไปต้มให้ร้อน ตวงใส่ลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร นำไปทำการย่อยหรือ reflux นาน 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย หลังจากนั้นทำการกรอง โดยเทสารละลายในบีกเกอร์ ลงครูซิเบิ้ลที่ชั่งน้ำหนักแล้วที่ติดต่อกับเครื่อง กรองดูดสูญญากาศ ล้างตัวอย่างที่อยู่ในบีกเกอร์ ด้วยขวดฉีดน้ำร้อน จนกระทั่งตัวอย่างส่วนที่เหลือทั้งหมดลงในครูซิเบิ้ลจนหมด ล้างตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิ้ลจนหมดฟอง จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ล ด้วยน้ำร้อนอีก 1-2 ครั้ง โดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน แล้วดูดน้ำออกด้วย vacuum pump ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบ เอาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาค่า ADF จากนั้นนำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักหาเถ้า

**การคำนวณ**

$$\%ADF = \frac{[(W_1 - W_2) \times 100]}{W_3} - \%\ \text{Acid Insoluble Ash}$$

$W_1$ = **น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักตัวอย่าง**

$W_2$ = **น้ำหนักครูซิเบิ้ล**

$W_3$ = **น้ำหนักตัวอย่าง**

**วิธีวิเคราะห์หา** Acid Detergent Lignin (ADL)

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หา ADFแล้ว มาเติมสารละลายร้อยละ 72 $H_2SO_4$ ที่เย็น (20 องศาเซลเซียส) ลงไป ประมาณครึ่งครูซิเบิ้ล จากนั้นนำไปวางลงในถาดสแตนเลส ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วเพื่อให้ตัวอย่างแยกจากกันไปจับตัวเป็นก่อน โดยมีน้ำกลั่นที่อยู่ในถาดสแตนเลสระดับต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับของแผ่น Fritted glass รักษาอุณหภูมิของครูซิเบิ้ล ในถาดสแตนเลสที่ 20-30 องศาเซลเซียส คอยเติมสารละลายร้อยละ 72 $H_2SO_4$ เมื่อสารละลายในครูซิเบิ้ลแห้ง คนเป็นระยะๆใช้เวลาย่อยนาน 3 ชั่วโมงจากนั้นนำไปดูดเพื่อล้างสารละลายกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำร้อน จากนั้นใช้ขวดฉีดน้ำไล่ตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ลให้หมด แล้วฉีดล้างครูซิเบิ้ลอีกหนึ่งครั้ง นำครูซิเบิ้ลพร้อมตัวอย่างที่ย่อยแล้ว นำไปอบในตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นนำออกใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก

**การคำนวณ**

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{(W_1 - W_4)}{W_3} \times 100$$

$W_1$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนัก ADF

$W_4$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ

$W_3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

3.8.2.2 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (Van และคณะ, 1991)

วิธีวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)

นำครูซิเบิ้ลขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก จากนั้นชั่งตัวอย่างที่แห้งบดละเอียด ขนาด 300 ไมโครเมตร ใส่ในบีกเกอร์ปากกลมเรียบ(ใส่ $Na_2SO_3$ 0.5 กรัม ในตัวอย่างที่มีคิวตินสูง) แล้วนำสารละลาย Neutral Detergent Fiber ไปต้มให้ร้อนประมาณ 5 นาที ตวงใส่ลงในบีกเกอร์ ที่มีตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร นำไปทำการย่อย หลัง 5 นาที เขย่าบีกเกอร์ แล้วยกลง ทำการกรอง โดยเทสารละลายในบีกเกอร์ ลงในครูซิเบิ้ล ที่ชั่งน้ำหนักแล้วที่ต่อติดกับเครื่องดูดสุญญากาศ ล้างตัวอย่างที่อยู่ในบีกเกอร์ ด้วยขวดฉีดน้ำร้อน จนกระทั่งตัวอย่างส่วนที่เหลือทั้งหมดลงในครูซิเบิ้ลจนหมด ล้างตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิ้ลจนหมดฟอง จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ล ด้วยน้ำร้อนอีก 1-2 ครั้ง โดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน แล้วดูดน้ำออกด้วย vacuum pump ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบ เอาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณหาค่า ADF จากนั้นนำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักหาเถ้า

**การคำนวณ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\%NDF = \frac{[(W_1-W_2)\times 100]}{W_3} - \%\ \text{Neutral Insoluble Ash}$$

$W_1$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักตัวอย่าง

$W_2$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล

$W_3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

**%เฮมิเซลลูโลส** = %NDF- %ADF

**3.8.2.3 ปริมาณลิกนิน (Van และคณะ, 1991)**

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หาเซลลูโลสแล้ว นำไปเผาในเตาเผา 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักหาลิกนิน

**การคำนวณ**

$$\%\ \text{ลิกนิน} = \frac{W_4-W_5}{W_3} \times 100$$

$W_4$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ

$W_5$ = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักเยื่อใยหลังการเผา

$W_3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

**3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี**

**3.8.3.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)**

นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี 3,5dinitrosalicylic acid (DNS) ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละการเจือจางมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยวิธีดังต่อไปนี้

เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.3.2 น้ำหนักชีวมวลแห้ง**

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นใน เดสิเคเตอร์ (desiccator) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักหลอดและนำตัวอย่างมาปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมลงไปและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที เพื่อเซลล์ตกตะกอน เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน เดสิเคเตอร์ (desiccator) ทำการชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

**การคำนวณ**

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}) \times 1000}{3}$$

**3.8.3.3 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังปรับสภาพโดยใช้เครื่อง HPLC**

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากหัวข้อ 3.5 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาทีนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้กลีเซอรอลร้อยละ 5 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาล ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

**3.8.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอินทรีย์อื่นๆ**

นำส่วนใสของตัวอย่างจากหัวข้อ 3.7 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที นำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอ เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทิริกโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amines®Fermentation Monitor เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้ คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### 3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำอย่างต่ำ 3 ซ้ำและนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 23) วิเคราะห์ตาราง ANOVA และค่าความแปรปรวนที่ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ $P < 0.05$ เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีของ Ducan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาหาแหล่งน้ำตาลราคาถูก โดยทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งซึ่งคือ เปลือกเผือก ด้วยเอนไซม์ผสม เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในโครงงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองโดยการนำเปลือกเผือกมาเป็นแหล่งน้ำตาล โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine, GYCC) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลดังกล่าวเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม

โดยเริ่มทำการทดลองโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือกบด ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต จากนั้นนำไปทำการปรับสภาพเปลือกเผือกก่อนทำการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น เพื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาณ 0 – 1.0 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ แต่ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ทำการปรับสภาพด้วยกรด เบส และน้ำกลั่นก่อนนำมาย่อยให้ผลของน้ำตาลรีดิวซ์น้อย จึงทำการเปลี่ยนวิธีโดยทำการนำเปลือกเผือกไปให้ความร้อนให้เกิดการ Gelatinization แล้วจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 และทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งได้ค่าของน้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณน้อย จึงเปลี่ยนวิธีมาเป็นการใช้เอนไซม์ผสม คือ เอนไซม์ ACCELLERASE1500 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

จากนั้นทำการทดลองโดยการถ่ายเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เก็บในอาหารเหลว RCM ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสมา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว RCM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยนำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตร ที่ได้ต่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งคาร์บอนเป็นเปลือกเผือก ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 6 วัน โดยจะเก็บตัวอย่างปริมาตร 7 มิลลิลิตรในทุกๆวัน

นำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำการเก็บทุกช่วงเวลาไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที วิเคราะห์ค่า pH วัดความขุ่นของปริมาณเซลล์ทั้งหมดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) วิเคราะห์หาค่า pH ของน้ำหมักและวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ( HPLC )

## 4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือก

จากการทดลองในการวิเคราะห์องค์ประกอบเปลือกเผือก โดยนำเปลือกเผือกที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบด Retsch รุ่น SK100 แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ องค์ประกอบของเปลือกเผือก ศึกษาการปรับสภาพเปลือกเผือก การย่อยด้วยเอนไซม์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ

### 4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือก

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือก พบว่าในเปลือกเผือกที่ผ่านการอบแห้งนั้นมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 77.00 เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด รองลงมาคือปริมาณโปรตีน เยื่อใยหยาบ ไขมัน และเถ้า คือ ร้อยละ 6.75, 3.35, 0.74 และ 0.52 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของเปลือกเผือกที่ใช้ในการทดลอง**

| องค์ประกอบ | สัดส่วน (คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|
| โปรตีน | 6.75 |
| ไขมัน | 0.74 |
| เยื่อใยหยาบ | 3.35 |
| เถ้า | 0.52 |
| คาร์โบไฮเดรต | 77.00 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ส่วนประกอบของเปลือกเผือกที่ใช้ในการทดลอง**

| องค์ประกอบ | สัดส่วน (คิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง) |
|---|---|
| เซลลูโลส | 7.67 |
| เฮมิเซลลูโลส | 8.70 |
| ลิกนิน | 3.65 |

จากการศึกษาของ สุขฤดี (2547) ได้ศึกษาสมบัติของสตาร์ชที่สกัดจากเผือกหอม *Colocasia esculenta* (L.) Schott พบว่า องค์ประกอบโดยน้ำหนักแห้งของเผือกหอมคือ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 83.1-91.7 ไขมันร้อยละ 0.3-0.9 โปรตีนร้อยละ 4.2-9.3 ใยอาหารร้อยละ 1.1-3.5 เถ้าร้อยละ 2.0-5.1 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ในโครงงานวิจัยนี้พบว่ามีปริมาณไขมัน โปรตีน และเยื่อใยหยาบที่ใกล้เคียงกัน โดยทั้งนี้องค์ประกอบทั้งปริมาณคาร์โบไฮเดรต เถ้า รวมถึงองค์ประกอบอื่นๆ จะมีความแตกต่างกันไป อาจเนื่องจากเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบของหัวเผือก ส่วนในโครงงานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบของเปลือกเผือกเพียงอย่างเดียว จึงทำให้มีองค์ประกอบบางประการที่แตกต่างกันไป

สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบประเภทเยื่อใยของเปลือกเผือก ซึ่งได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งการวิเคราะห์นั้นได้ทำการส่งตัวอย่างผงเปลือกเผือกไปวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยทำการหาร้อยละ NDF ร้อยละ ADF และร้อยละ ADL พบว่าเปลือกเผือกที่ได้นำมาใช้ในโครงงานวิจัยนี้ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมากที่สุดคือร้อยละ 8.7 รองลงมาเป็นเซลลูโลสมีปริมาณร้อยละ 7.67 และลิกนินร้อยละ 3.65 ดังตารางที่ 4.1

## 4.2 การศึกษาการปรับสภาพและการย่อยเบื้องต้น

### 4.2.1 การปรับสภาพเปลือกเผือกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

จากการนำผงเปลือกเผือกบดที่ผ่านการร่อนขนาดรูพรุน 300 ไมโครเมตร มาทำการปรับสภาพก่อนการย่อย โดยปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยปรับสภาพตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม และปริมาตรสารละลาย 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใช้วิธีการปรับสภาพโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ให้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยหลังทำการปรับสภาพเปลือกเผือกได้ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของของเหลวจากการปรับสภาพ แล้วทำการล้างน้ำและทำการอบ แล้วจึงนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 แล้วทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อย พบว่าเปลือกเผือกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 9.64 กรัมต่อลิตร และรองลงมาคือเปลือกเผือกที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดและน้ำกลั่น ซึ่งได้เท่ากับ 7.77 กรัมต่อลิตร และ 5.23 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และจากผลในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 เปลือกเผือกน่าจะมีแป้ง (Starch) เป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง จึงได้ทำให้ปริมาณรีดิวซ์น้อยเนื่องจากใช้เอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยซึ่งอาจจะทำให้ไปย่อยได้ไม่ตรงกับองค์ประกอบของเปลือกเผือกส่วนมาก

### 4.2.2 การย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

นำเปลือกเผือกบดปริมาณ 10 กรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาทำการต้มให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการแตกตัว แล้วเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิเหลือ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่ม 4 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้คือ 8.54 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเปลือกเผือกมีแป้ง (Starch) เป็นองค์ประกอบมากกว่าปริมาณของเซลลูเลสจึงสามารถใช้เอนไซม์อะไมเลสย่อยได้

### 4.3.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ผสม

หลังจากที่ลองทำการทดลองย่อยเปลือกเผือกบดโดยเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์อะไมเลสแล้ว พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีปริมาณน้อย จึงทำการย่อยโดยใช้เอนไซม์ผสมคือ เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3.33 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 13.33 มิลลิลิตร โดยใช้เปลือกเผือกบดปริมาณ 10 กรัม ต่อปริมาตรน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยหลังจากทำการย่อยแล้วนำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS แล้วพบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นมากกว่าใช้เพียงเอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่ง คือ 31.79 กรัมต่อลิตรดังตารางที่ 4.2 จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวนี้มาเพื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก และการนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

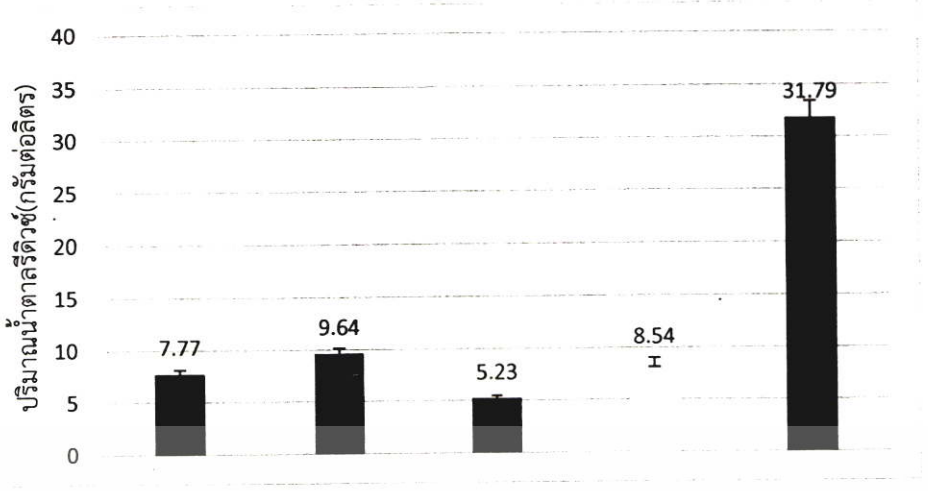
**ตารางที่ 4.2** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

| การย่อยด้วยเอนไซม์ | การปรับสภาพ | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 | กรด<br>เบส<br>น้ำกลั่น | 7.77<br>9.64<br>5.23 |
| เอนไซม์อะไมเลส | ต้ม | 8.54 |
| เอนไซม์ผสม | ต้ม | 31.79 |

จากการศึกษาของณัฐพงษ์ และเศรษฐวัชร, (2558) ซึ่งศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ โดยในขั้นตอนการศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยย่อยกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกันคือ เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อยกากมันสำปะหลังสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งได้ผลเหมือนกันกับการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อย เมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในการย่อยกากมันสำปะหลังพบว่า สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูง โดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส ตามลำดับสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ปริมาณสูงที่สุดคือ 82.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสที่ย่อยเม็ดแป้งที่เกาะอยู่บริเวณนอกเส้นใยของกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่ง และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ย่อยเส้นใยเซลลูโลส ทำให้เม็ดแป้งที่อยู่ด้านในเส้นใยหลุดออก เป็นผลให้แป้งถูกเอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยกลายเป็นน้ำตาลได้อีก

ดังนั้นจากตารางที่ 4.2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสของเปลือกเผือกที่ผ่านการต้มและย่อยต่อด้วยเอนไซม์ผสมของแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส จึงพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด แสดงให้เห็นว่าแอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสได้ย่อยแป้งที่เกาะอยู่ภายนอกเส้นใยของเปลือกเผือก และเอนไซม์เซลลูเลสได้ทำการย่อยเส้นใยเซลลูโลส ทำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในปริมาณมากคือ 31.79 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.1** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน สัญลักษณ์ : การปรับสภาพและชนิดของเอนไซม์ ( ■ ) ปรับสภาพด้วยกรดและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ( ▨ ) ปรับสภาพด้วยเบสและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ( ■ ) ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ( □ ) ปรับสภาพด้วยการต้มและย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ( ▨ ) ปรับสภาพด้วยการต้มและย่อยด้วยเอนไซม์ผสม

## 4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก

### 4.3.1 ปริมาณเปลือกเผือก

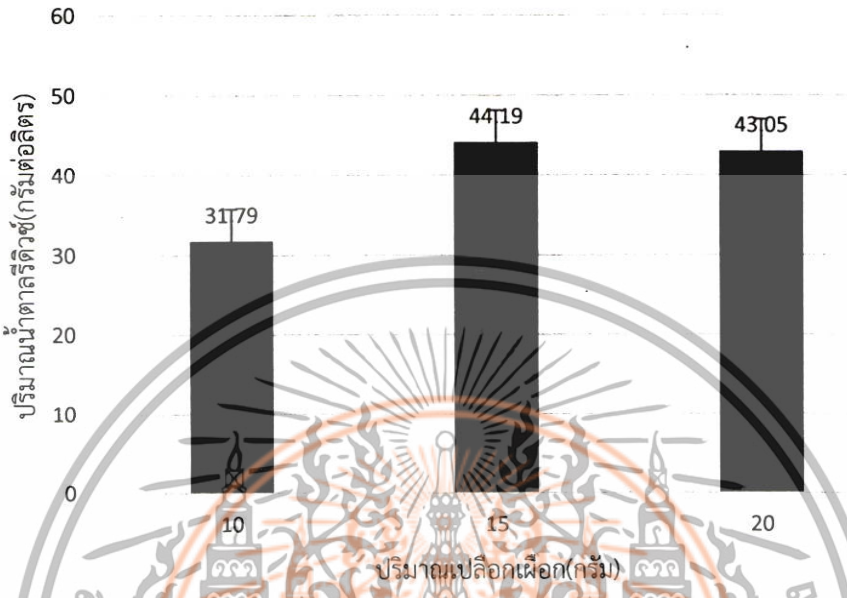
จากการทดลองใช้น้ำหนักของเปลือกเผือกปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 10 กรัม 15 กรัม และ 20 กรัม โดยทำการย่อยโดยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (ตารางที่ 4.3) ใช้เวลาในการย่อยนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า ที่ปริมาณเปลือกเผือก 15 กรัม ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด คือ 44.19 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลลดลงเมื่อใช้ปริมาณเปลือกเผือก 10 กรัม เนื่องจากเป็นเพราะว่าปริมาณเปลือกเผือก 10 กรัม ต่อสารละลายเอนไซม์ไม่เหมาะสมกันทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปย่อยเปลือกเผือกได้ดีจึงให้น้ำตาลรีดิวซ์น้อย

**ตารางที่ 4.3** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้เปลือกเผือกในปริมาณที่แตกต่างกัน

| ปริมาณเปลือกเผือก (กรัม) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| 10 | $31.79^{b} \pm 2.90$ |
| 15 | $44.19^{a} \pm 3.89$ |
| 20 | $43.05^{a} \pm 3.52$ |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หมายเหตุ** a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน




**รูปที่ 4.2** ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสหลังการย่อยเปลือกเผือกในปริมาณที่แตกต่างกันด้วยเอนไซม์ผสม สัญลักษณ์ : ปริมาณเปลือกเผือก ( ) 10 กรัม ( ) 15 กรัม ( ) 20 กรัม

เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่ 15 กรัม คือ 44.19 กรัมต่อลิตร และ 20 กรัม คือ 43.05 กรัมต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนรายละเอียดการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงในภาคผนวก ข จากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเปลือกเผือก 15 กรัม ส่งผลทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ สูงที่สุดคือ 44.19 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ปริมาณเปลือกเผือก 20 กรัม และ 10 กรัม ได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 43.05 กรัมต่อลิตร และ 37.79 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จึงเลือกปริมาณเปลือกเผือก 15 กรัมไปทำการทดลองต่อไป

### 4.3.2 ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองใช้เอนไซม์ผสมคือ เอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ในการย่อยตัวอย่างเปลือกเผือก โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.3) คือ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่ 1.0 มิลลิลิตร ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด คือ 33.18 กรัมต่อลิตร ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เซลลูเลสที่ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8 มิลลิลิตร ได้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 25.56 กรัมต่อลิตร 32.03 กรัมต่อลิตร 29.36 กรัมต่อลิตร 31.33 กรัมต่อลิตร และ 30.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส ที่ 0.2 มิลลิลิตร จึงเลือกปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส 0.2 มิลลิลิตร ไปทำการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 4.4** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกัน

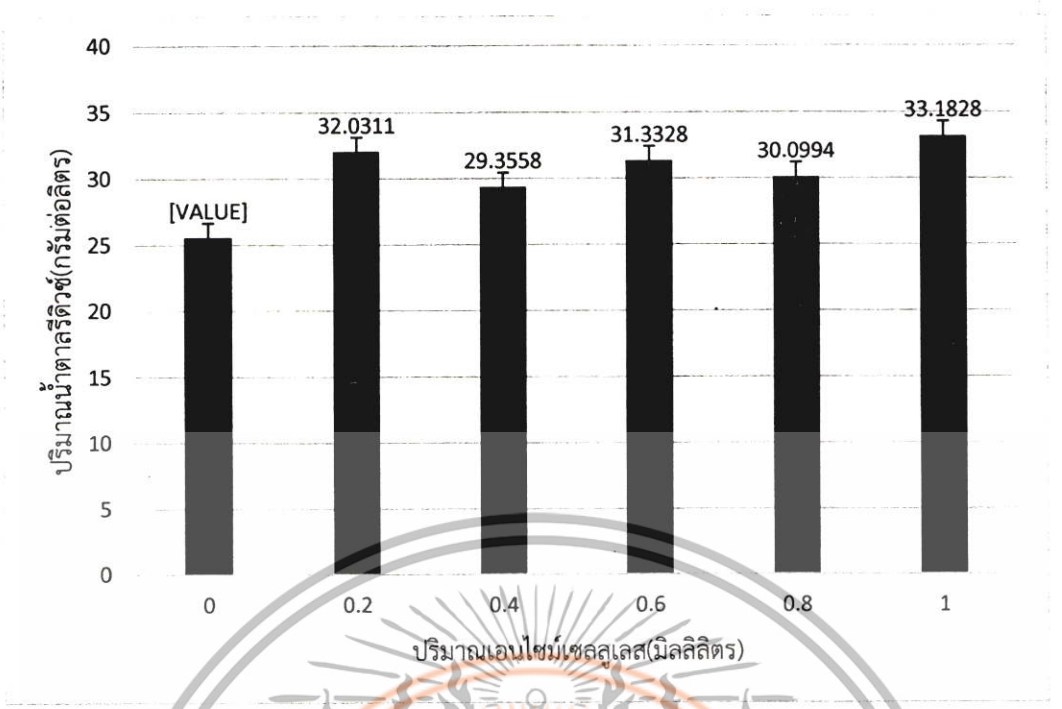
| ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลส (มิลลิลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| 0.0 | $25.56^{b} \pm 1.33$ |
| 0.2 | $32.03^{a} \pm 1.14$ |
| 0.4 | $29.36^{ab} \pm 4.59$ |
| 0.6 | $31.33^{a} \pm 0.42$ |
| 0.8 | $30.10^{ab} \pm 3.76$ |
| 1.0 | $33.18^{a} \pm 1.39$ |

**หมายเหตุ** a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**4.3.3 การใช้บัฟเฟอร์และน้ำกลั่นในการเตรียมเอนไซม์อะไมเลส**

จากการทดลองหลังจากที่ได้สภาวะในการย่อยเปลือกเผือกทั้งปริมาณเปลือกเผือก และปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสแล้ว จึงนำสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดมาทำการย่อยตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นแทนอะซีเตตบัฟเฟอร์ในการเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อนำเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นไปย่อยเปลือกเผือก ผสมกับเอนไซม์เซลลูเลส แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมโดยที่ใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ในการเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 30 กรัมต่อลิตร ในการย่อยเปลือกเผือกเพื่อเพาะเลี้ยง *Clostridium accetobutylicum* จึงใช้น้ำแทนบัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.3** ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่แตกต่างกัน สัญลักษณ์ : ปริมาณเปลือกเผือก ( ) 0.0 มิลลิลิตร ( ) 0.2 มิลลิลิตร ( ) 0.4 มิลลิลิตร ( ) 0.6 มิลลิลิตร ( ) 0.8 มิลลิลิตร ( ) 1.0 มิลลิลิตร

**ตารางที่ 4.5** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนเปลือกเผือก ที่ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ผสมของเอนไซม์เซลลูเลส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยใช้ตัวทำละลายในการเตรียมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่แตกต่างกัน

| สารที่ใช้เตรียมเอนไซม์อะไมเลส | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| บัฟเฟอร์ | 30.60 ± 3.36 |
| น้ำกลั่น | 30.12 ± 1.52 |

**หมายเหตุ** : ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมโดยใช้เครื่อง HPLC นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้กลีเซอรอล 5 เปอเซ็นต์ สำหรับเป็น Internal standard วิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานชนิดน้ำตาลต่างๆ ผลเป็นดังตารางที่ 4.6 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 12.06 กรัมต่อ น้ำตาลมอลโตส 1.80 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลเซลโลไบโอส ไม่สามารถพบได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างเปลือกเผือกมีเฮมิเซลลูโลสในปริมาณน้อยมากจึงทำให้ไม่พบน้ำตาลไซโลส และการที่ไม่พบน้ำตาลเซลโลไบโอสนั้น อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เซลลูเลสเข้าไปย่อยเซลลูโลสจนไม่เหลือน้ำตาลโมเลกุลคู่

**ตารางที่ 4.6** ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม

| ชนิดน้ำตาล | ความเข้มข้นน้ำตาล(กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| Glucose | 12.06 ± 0.49 |
| Maltose | 1.80 ± 0.21 |
| Xylose | - |
| Cellubiose | - |

**หมายเหตุ** : ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## 4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

### 4.4.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

จากรูปที่ 3 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักด้วยวิธี DNS ทำการวัดค่าพีเอชของน้ำหมัก และค่าความขุ่นของเซลล์ จากการทดลองในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้ทำการเติมอาหารทุกช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อมีการเจริญค่อนข้างน้อย จากระยะเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 58.58 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชคือ 5.7 และค่าความขุ่นของเซลล์ ได้เท่ากับ 0.394 ต่อมาในชั่วโมงที่ 12 จำนวนของน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเพิ่มขึ้น เป็น 1.38 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง เป็น 50.53 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอช 4.7 และค่าความขุ่นของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 1.752 ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นในชั่วโมงที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นและลดลงสลับกัน ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 1.57 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 36 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดคือ 2.52 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 48 มีค่าน้ำหนักเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห้งลดลงเป็น 2.31 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชที่วัดได้คือ 4.5 และวัดค่าความขุ่นเซลล์ที่ได้คือ 1.894 หลักจากนั้นการค่าของน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มคงที่ ซึ่งในชั่วโมงที่ 72, 96 และ 120 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.40 กรัมต่อลิตร, 2.42 กรัมต่อลิตร และ 2.48 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนค่าของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็มีแนวโน้มลดลงคือ ที่ชั่วโมง 72 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้คือ 48.90 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 96 เป็น 47.19 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 120 เป็น 47.74 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชนั้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ถึงชั่วโมงที่ 120 มีแนวโน้มคงที่คือค่าพีเอชอยู่ที่ 4.5 เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรมทางสถิติ จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.6)

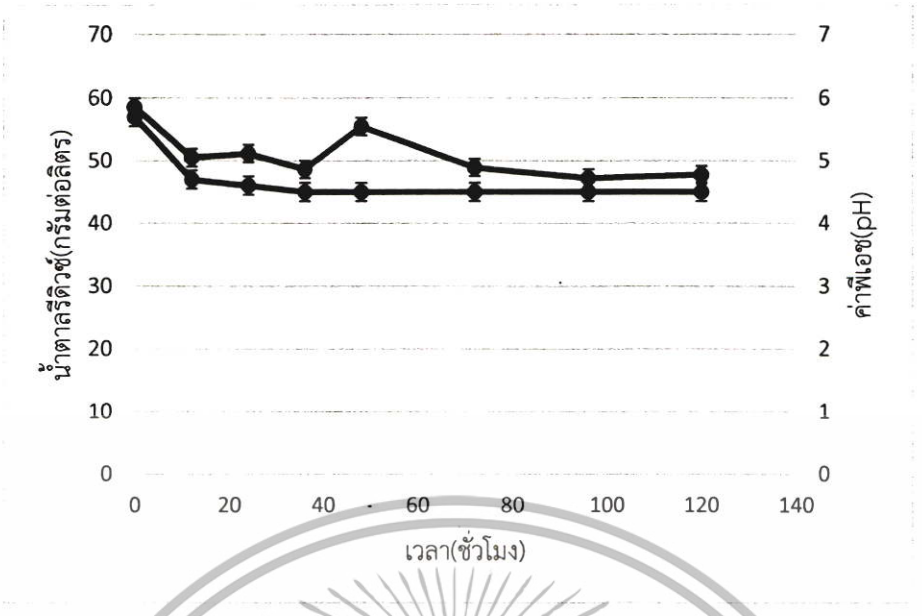
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกเพื่อใช้แทนน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร จากตารางที่ 4.8 จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีลักษณะขึ้นลงตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 0 – 72 ชั่วโมง เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุดคือชั่วโมงที่ 120 น้ำหนักเซลล์แห้งคือ 2.77 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นของเซลล์ เท่ากับ 1.128 และมีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดคือ 79.55 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าพีเอช เริ่มต้น ชั่วโมงที่ 0 ค่าพีเอชเป็น 4.6 จากนั้น ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12-48 ชั่วโมง ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 4.7 แล้ว ชั่วโมงที่ 96-120 ชั่วโมง ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอีกเป็น 4.8

**ตาราง 4.7** ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | ค่าพีเอช | ค่าความขุ่นของเซลล์ |
|---|---|---|---|---|
| 0 | $0.98^{c} \pm 0.20$ | $58.58^{a} \pm 2.88$ | $5.7^{a} \pm 0.05$ | $0.394^{c} \pm 0.016$ |
| 12 | $1.38^{b} \pm 0.13$ | $50.53^{ab} \pm 4.92$ | $4.7^{b} \pm .003$ | $1.752^{b} \pm 0.030$ |
| 24 | $1.57^{b} \pm 0.03$ | $51.11^{ab} \pm 4.09$ | $4.6^{c} \pm 0.02$ | $1.657^{b} \pm 0.169$ |
| 36 | $2.52^{a} \pm 0.14$ | $48.61^{b} \pm 4.62$ | $4.5^{d} \pm 0.20$ | $1.982^{a} \pm 0.059$ |
| 48 | $2.31^{a} \pm 0.25$ | $55.46^{ab} \pm 7.23$ | $4.5^{de} \pm 0.01$ | $1.894^{a} \pm 0.049$ |
| 72 | $2.40^{a} \pm 0.31$ | $48.90^{b} \pm 4.74$ | $4.5^{de} \pm 0.01$ | $1.980^{a} \pm 0.028$ |
| 96 | $2.42^{a} \pm 0.03$ | $47.19^{b} \pm 2.28$ | $4.5^{e} \pm 0.01$ | $1.958^{a} \pm 0.023$ |
| 120 | $2.48^{a} \pm 0.19$ | $47.74^{b} \pm 3.47$ | $4.5^{e} \pm 0.01$ | $1.937^{a} \pm 0.010$ |

**หมายเหตุ** a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.4** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมเซลลูเลส ACCELLERASE1500, แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส และค่าพีเอช ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ สัญลักษณ์ : (●) ค่าพีเอช (◐) ค่าน้ำตาลรีดิวซ์

**ตารางที่ 4.8** ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และค่าความขุ่นของเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างเปลือกเผือกความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | ค่าพีเอช | ค่าความขุ่นของเซลล์ |
|---|---|---|---|---|
| 0 | $0.78^{e} \pm 0.05$ | $66.27^{bc} \pm 3.78$ | $4.6^{e} \pm 0.03$ | $0.745^{d} \pm 0.011$ |
| 12 | $1.53^{d} \pm 0.35$ | $60.43^{cd} \pm 2.66$ | $4.7^{d} \pm 0.01$ | $1.038^{abc} \pm 0.141$ |
| 24 | $1.04^{e} \pm 0.11$ | $64.32^{bcd} \pm 6.23$ | $4.7^{d} \pm 0.03$ | $0.738^{d} \pm 0.096$ |
| 36 | $1.51^{d} \pm 0.13$ | $52.89^{d} \pm 12.72$ | $4.7^{c} \pm 0.01$ | $0.991^{bc} \pm 0.011$ |
| 48 | $1.98^{c} \pm 0.19$ | $63.08^{bcd} \pm 5.73$ | $4.7^{c} \pm 0.00$ | $0.940^{c} \pm 0.013$ |
| 72 | $2.49^{ab} \pm 0.05$ | $61.99^{cd} \pm 4.30$ | $4.8^{b} \pm 0.01$ | $1.066^{ab} \pm 0.009$ |
| 96 | $2.29^{b} \pm 0.10$ | $74.58^{ab} \pm 7.33$ | $4.8^{a} \pm 0.01$ | $1.047^{abc} \pm 0.060$ |
| 120 | $2.77^{a} \pm 0.15$ | $79.55^{a} \pm 4.13$ | $4.8^{a} \pm 0.00$ | $1.128^{a} \pm 0.021$ |

**หมายเหตุ** a, b, c, d, e ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยจากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือก จะพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคสทำให้เชื้อเจริญได้เร็วกว่า โดยที่เวลา 12 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้น คือ 1.38 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือก การเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยดูจากน้ำหนักเซลล์แห้ง เพียงแค่ 1.53 กรัมต่อลิตร

### 4.4.2 การสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

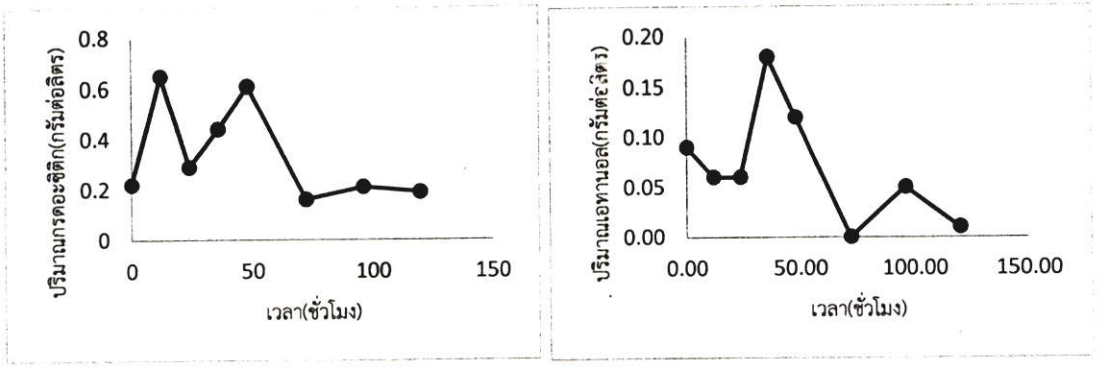
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคส โดยมีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุม และมีแหล่งน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม โดยมีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาเพื่อนำมาวิเคราะห์ กรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอิทรีย์ จากการนำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ส่วนใสนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography)

จากการศึกษาผลของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากรูปที่ 4.5 และตาราง 4.9 เมื่อเวลาเริ่มต้น คือที่ 0 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะซิติก 0.22 กรัมต่อลิตร และ ชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด คือ 0.65 กรัมต่อลิตร จากนั้นพบว่าชั่วโมงที่ 24 – 48 ชั่วโมง จะพบว่ามีค่าขึ้นและลดลง จนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณกรดอะซิติกน้อยที่สุด หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น เป็น 0.21 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณกรดอะซิติกลดลง คือ 0.19 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

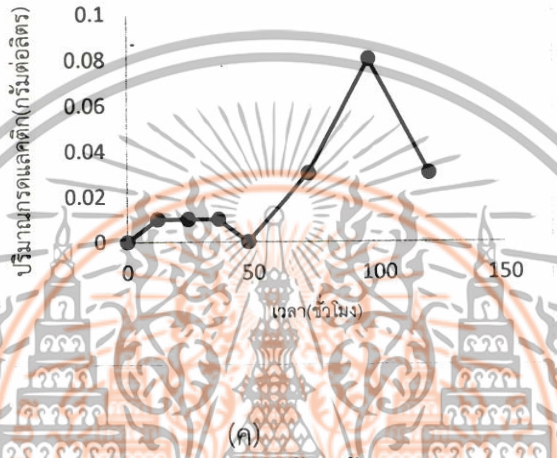
เมื่อนำน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์ จะได้ค่าความเข้มข้นของกรดแลคติก รูปที่ 4.5 ค โดยค่าเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 ยังไม่พบปริมาณของกรดแลคติก และในชั่วโมงต่อมา ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12-36 มีปริมาณของกรดแลคติกเท่ากัน คือ 0.01 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นพบว่าชั่วโมงที่ 48 ไม่พบปริมาณกรดแลคติก ชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุดคือมีค่าเป็น 0.08 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณของกรดแลคติกลดลง คือ 0.03 กรัมต่อลิตร

ผลของการทดสอบเอทานอล พบว่าค่าของเอทานอลเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 คือ 0.09 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 12-24 ชั่วโมง มีปริมาณเอทานอลลดลงเป็น 0.06 กรัมต่อลิตร พบว่าชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 0.18 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 48-120 มีแนวโน้มปริมาณของเอทานอลลดน้อยลง คือที่ชั่วโมง 48 ปริมาณเอทานอล เป็น 0.12 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 72 ไม่พบปริมาณของเอทานอล ชั่วโมงที่ 96 ปริมาณของเอทานอลคือ 0.05 กรัมต่อลิตร และชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเอทานอล คือ 0.01 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




(ก) (ข)




(ค)

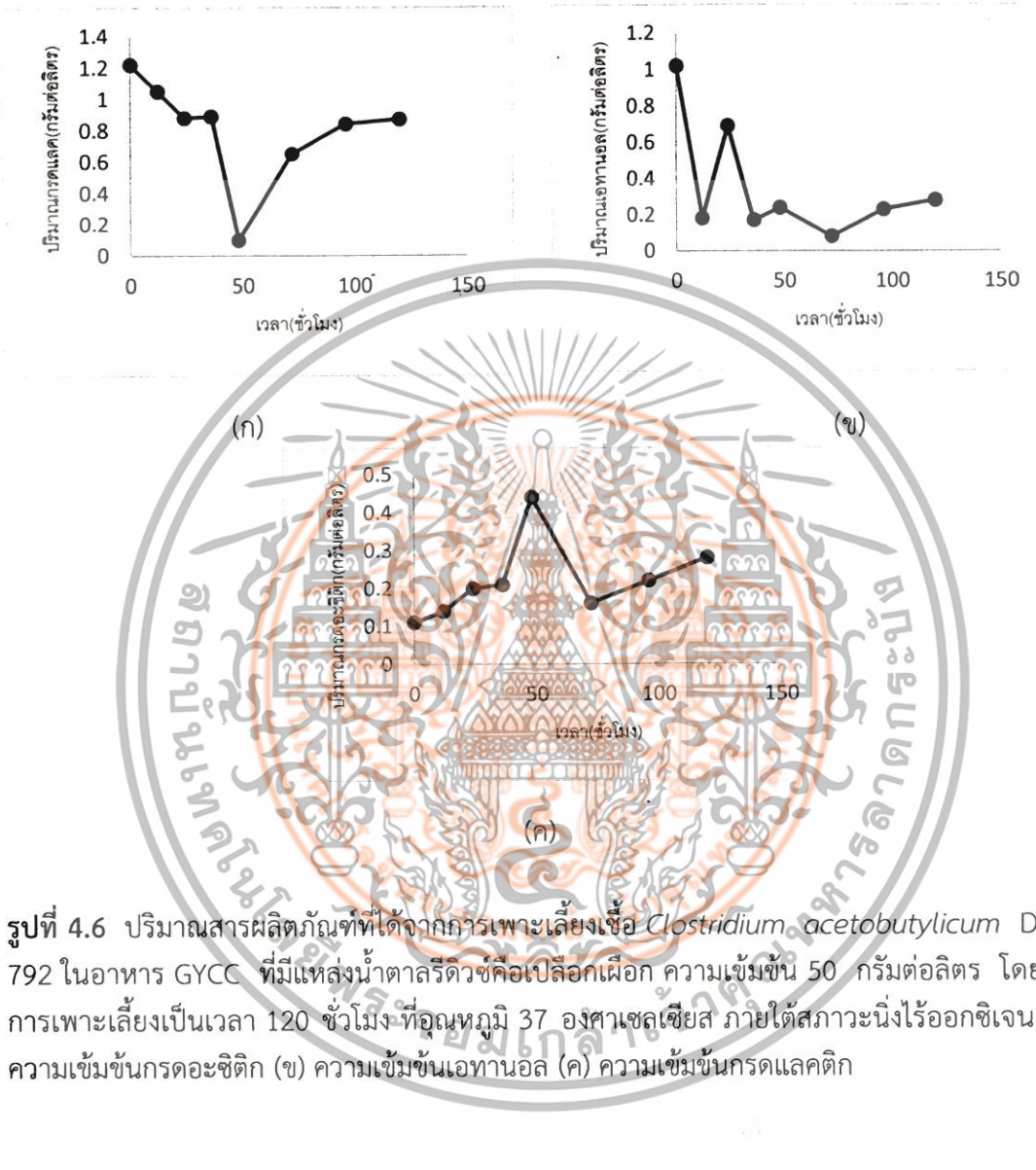
**รูปที่ 4.5** ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน (ก) ความเข้มข้นกรดอะซิติก (ข) ความเข้มข้นเอทานอล (ค) ความเข้มข้นกรดแลคติก

และเมื่อทำการศึกษาผลของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เปลือกเผือกเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12-48 โดยพบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 คือ 0.44 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณกรดอะซิติกมีการลดลงและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 96-120 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.5 ก

จากการวิจัยข้างต้น ได้ค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 อยู่ที่ 1.22 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้นข้นที่สูงสุด และต่อมาในชั่วโมงที่ 12-48 ความเข้มข้นชองกรดแลคติกมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ และมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 72-120 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.5 ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการวิเคราะห์ผลความเข้มข้นเอทานอล พบว่า ความเข้นข้นของเอทานอลเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 คือ 1.02 กรัมต่อลิตร มีการลดลงและเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดในแต่ละชั่วโมงระยะเวลาของการหมักจนถึงชั่วโมง 120 120 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.12)




**รูปที่ 4.6** ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือเปลือกเผือก ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน (ก) ความเข้มข้นกรดอะซิติก (ข) ความเข้มข้นเอทานอล (ค) ความเข้มข้นกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.9** ความเข้มข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นของกรดแลคติก ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | กรดอะซิติก | กรดแลคติก |
| 0 | $0.22^{a} \pm 0.35$ | $0.00^{a} \pm 0.01$ |
| 12 | $0.65^{a} \pm 0.97$ | $0.01^{a} \pm 0.01$ |
| 24 | $0.29^{a} \pm 0.29$ | $0.01^{a} \pm 0.01$ |
| 36 | $0.44^{a} \pm 0.49$ | $0.01^{a} \pm 0.01$ |
| 48 | $0.61^{a} \pm 0.79$ | $0.00^{a} \pm 0.00$ |
| 72 | $0.16^{a} \pm 0.03$ | $0.03^{a} \pm 0.03$ |
| 96 | $0.21^{a} \pm 0.06$ | $0.08^{a} \pm 0.12$ |
| 120 | $0.19^{a} \pm 0.04$ | $0.03^{a} \pm 0.05$ |

**หมายเหตุ** a ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางที่ 4.10** ความเข้มข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นของกรดแลคติก ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | กรดอะซิติก | กรดแลคติก |
| 0 | $0.11^{a} \pm 0.09$ | $1.22^{a} \pm 0.21$ |
| 12 | $0.14^{a} \pm 0.17$ | $1.05^{a} \pm 0.79$ |
| 24 | $0.20^{a} \pm 0.19$ | $0.88^{a} \pm 0.41$ |
| 36 | $0.21^{a} \pm 0.19$ | $0.89^{a} \pm 0.64$ |
| 48 | $0.44^{a} \pm 0.52$ | $0.10^{a} \pm 0.51$ |
| 72 | $0.16^{a} \pm 0.10$ | $0.65^{a} \pm 0.36$ |
| 96 | $0.22^{a} \pm 0.10$ | $0.84^{a} \pm 0.16$ |
| 120 | $0.28^{a} \pm 0.07$ | $0.87^{a} \pm 0.21$ |

**หมายเหตุ** a, b, c, d, e ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.11** ความเข้มข้นของบิวทานอล และความเข้มข้นของเอทานอล ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์คือกลูโคส ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | บิวทานอล | เอทานอล |
| 0 | $0.0176^{a} \pm 0.0246$ | $1.02^{a} \pm 1.76$ |
| 12 | $0.0097^{a} \pm 0.0063$ | $0.18^{a} \pm 0.31$ |
| 24 | $0.0000^{a} \pm 0.0000$ | $0.69^{a} \pm 1.20$ |
| 36 | $0.0086^{a} \pm 0.0089$ | $0.17^{a} \pm 0.25$ |
| 48 | $0.0719^{a} \pm 0.1072$ | $0.24^{a} \pm 0.15$ |
| 72 | $0.0016^{a} \pm 0.0027$ | $0.08^{a} \pm 0.07$ |
| 96 | $0.0077^{a} \pm 0.0067$ | $0.23^{a} \pm 0.17$ |
| 120 | $0.0084^{a} \pm 0.0074$ | $0.28^{a} \pm 0.24$ |

**หมายเหตุ** a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางที่ 4.12** ความเข้มข้นบิวทานอล และความเข้มข้นของเอทานอล ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

| เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|
| | บิวทานอล | เอทานอล |
| 0 | $0.0075^{a} \pm 0.0044$ | $0.09^{a} \pm 0.08$ |
| 12 | $0.0000^{b} \pm 0.0000$ | $0.06^{a} \pm 0.11$ |
| 24 | $0.0035^{ab} \pm 0.0061$ | $0.06^{a} \pm 0.07$ |
| 36 | $0.0036^{ab} \pm 0.0031$ | $0.18^{a} \pm 0.31$ |
| 48 | $0.0018^{ab} \pm 0.0030$ | $0.12^{a} \pm 0.18$ |
| 72 | $0.0000^{b} \pm 0.0000$ | $0.00^{a} \pm 0.01$ |
| 96 | $0.0026^{ab} \pm 0.0045$ | $0.05^{a} \pm 0.04$ |
| 120 | $0.0020^{ab} \pm 0.0035$ | $0.01^{a} \pm 0.01$ |

**หมายเหตุ** a ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อการศึกษาแหล่งน้ำตาลจากเปลือกเผือกจากการปรับสภาพ และย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ผสม เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยใช้เปลือกเผือกเป็นวัตถุดิบพบว่า เปลือกเผือกมีองค์ประกอบทางเคมีเป็น เยื่อใยหยาบร้อยละ 3.35 ไขมันร้อยละ 0.74 เถ้าร้อยละ 0.52 โปรตีนร้อยละ 6.75 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 77.00 นอกจากนี้ ยังมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 7.67 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8.7 และลิกนินร้อยละ 3.65

จากนั้นนำไปทำการปรับสภาพเปลือกเผือกก่อนทำการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 1 โมลาร์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ หรือน้ำกลั่น และนำตัวอย่างไปเข้าหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นนำเฉพาะส่วนของแข็งมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ทำการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด คือ 7.77 กรัมต่อลิตร สารละลายเบสคือ 9.64 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่นคือ 5.23 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงทำการเปลี่ยนวิธีโดยทำการนำเปลือกเผือกไปให้ความร้อนให้เกิดการ Gelatinization แล้วจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ได้ค่าของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 8.54 กรัมต่อลิตร ซึ่งก็ยังไม่เพียงพอ จึงเปลี่ยนวิธีมาเป็นการใช้เอนไซม์ผสม คือ เอนไซม์ ACCELLERASE1500 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และ เอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบคือ 31.79 กรัมต่อลิตร จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยเปลือกเผือก โดยในการศึกษาปริมาณเปลือกที่เหมาะสมต่อการย่อย โดยใช้เปลือกเผือก 10 กรัม, 15 กรัม และ 20 กรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ผสม ผลของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ย่อยเปลือกเผือก 10 กรัม ได้เท่ากับ 31.79 กรัมต่อลิตร 15 กรัมได้เท่ากับ 44.19 กรัมต่อลิตร และ 20 กรัมได้เท่ากับ 43.05 กรัมต่อลิตร จึงเลือกปริมาณเปลือกเผือก 15 กรัมมาทำการศึกษาการใช้ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อ โดยนำเปลือกเผือก 15 กรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ผสม โดยใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาณที่แตกต่างกันคือ 0 – 1.0 มิลลิลิตร พบว่า ผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม โดยใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ได้เท่ากับ 32.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร และทำการศึกษาการใช้บัฟเฟอร์และน้ำกลั่นในการเตรียมเอนไซม์อะไมเลส โดยทำการเปรียบเทียบผลน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ที่ใช้น้ำกลั่นแทนอะซีเตตบัฟเฟอร์ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้พบว่า ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากการใช้บัฟเฟอร์เท่ากับ 30.06 กรัมต่อลิตร และน้ำกลั่นเท่ากับ 30.12 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้น้ำกลั่นในการเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมเลสที่ใช้ในการย่อยเปลือกเผือก

ทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมโดยใช้เครื่อง HPLC พบน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส ความเข้มข้น 12.06 กรัมต่อลิตร และ 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ไม่พบน้ำตาลไซโลสและเซลโลไบโอส ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสภาวะการย่อยเปลือกเผือกดังกล่าว เพื่อไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acrtobutylicum* DSM 792 ใช้อาหาร GYCC ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมง 120 คือ 2.77 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาที่ 120 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 79.55 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาเริ่มต้นมีพีเอชมากที่สุดที่ 4.8 พบกรดอะซิติกสูงสุดชั่วโมงที่ 48 ความเข้มข้น 0.44 กรัมต่อลิตรและเอทานอลสูงสุดชั่วโมงที่ 24 ความเข้มข้น 0.69 กรัมต่อลิตร

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acrtobutylicum* DSM 792 ใช้อาหาร GYCC ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสเป็นชุดควบคุม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมง 36 คือ 2.52 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 55.46 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาเริ่มต้นมีพีเอชมากที่สุดที่ 5.7 พบกรดอะซิติกสูงสุดชั่วโมงที่ 48 ความเข้มข้น 0.61 กรัมต่อลิตรและเอทานอลสูงสุดชั่วโมงที่ 36 ความเข้มข้น 0.18 กรัมต่อลิตร สรุปได้ว่าเชื้อนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตโดยผลิตกรดอะซิติก แลคติก และสร้างผลิตภัณฑ์เอทานอล และมีการสร้างผลิตภัณฑ์บิวทานอลในปริมาณ 0.07 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยมาก เนื่องจากไม่พบการผลิตกรดบิวทิริก

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาถึงการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized) ในแบบต่างๆ เพื่อให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์และได้ผลผลิต ABE ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized) จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการปรับปรุงกระบวนการผลิต ABE

2. ศึกษาสภาวะในการควบคุมค่าความเป็นกรดเบสของน้ำหมักในระยะต่างๆ ของการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ทั้งระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

3. ต่อยอดงานวิจัยออกไปโดยศึกษาหาสภาวะการใช้กรดบิวทิริกและวิตามินต่างๆ เพื่อช่วยเร่งและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ABE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2548. “ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม : มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำมันแก๊สโซฮอล”. เล่มที่122. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์กรุงเทพฯ

จิรนาถ บุญคง. 2554. “Resistant Starch ....แป้งที่มีบทบาทต่อสุขภาพ”. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 6(1): 1-18

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. “ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล.” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 22(3): 703- 709

ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล และ เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. 2558. “การศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์” รายงานการวิจัยสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ทิพวรรณ แตงสวน. 2554. “การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร.”รายงานการวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บัญชา พูลโภคา. 2557. “แอลกอฮอล์ I (Alcohols) : โครงสร้างและการเตรียม (Structure and Preparation).” เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พนิดา สวัสดี, รัตน์ฐาภัทร บุญเกิด และ ชัยยศ จันทร์แก้ว. 2558. “การศึกษาความเข้ากันได้ของพอลิเมอร์ผสมระหว่างยางพาราและแป้งมันสำปะหลัง ดัดแปรทางเคมี” รายงานวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชมงคลอีสาน.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. “Gelatinization / การเจลาติไนซ์” [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0350/gelatinization

ภูมิหทัย คูประเสริฐยิ่ง และ ประมุข กระถินสุขสถิตย์. 2554. “การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล.” นิตยสารเปิด “สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ” สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย 1(2): 1-11

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2558. “กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส” รายงานวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร.

วรพงษ์ นลินานนท์ และ สายชล เลิศสุวรรณ. 2554. “การศึกษาการใช้ประโยชน์กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในอาหารปลาโมง” รายงานการวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิราสิณี จันทร์เป็ง และ นพพล เล็กสวัสดิ์. 2557. “อะไมเลส (Amylase)” สาขาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศศิวิมล แสวงผล, เชฏฐ์ สาทรกิจ และ ทยา เจนจิตติกุล. 2546. “เผือก.” กรีนไฮเปอร์มาร์ท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซุปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.sc.mahidol.ac.th.

สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. "การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล." วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 22(5): 642- 649

สุนทร กาญจนทวี และ อภิชัย สาวิสิทธิ์. 2555. "การศึกษาการผลิตแอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสาปะหลังโดยกระบวนการหมัก." รายงานการวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ไสว พงษ์เก่า, โสภณ สินธุประมา และ สิรินทร์ ช่วงโชติ. 2523. "พืชหัว." สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน.เล่มที่5 : 163 - 170

อนันต์ ทองทา, มณฑิรา นพรัตน์, พนิต กิจสุบรรณ และ พงศ์พงา จางบัว. 2551. "การขยายขนาดการผลิตหัวอาหารสัตว์ที่มีปริมาณเอนไซม์สูง โดยการหมักแบบอาหารแข็งรา Aspergillus Oryzaeโดยใช้ถังหมักแบบหมุนขนาด 200 และ 600 ลิตร." รายงานการวิจัย สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อรุณี ศุภสินสาธิต 2555. "พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง." วารสารสิ่งแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 16(2): 36-42

อรนุช นาคชาติ. 2015. พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดโครงสร้าง (Structural polysaccharide). [Online] เข้าถึงได้จาก : http://science.srru.ac.th/org/scielearning/courseonline/4022503/chapter3-structural1.htm

อุกฤษฎ์ รัตนโฉมศรี, สุทิพา ธนพงษ์พิพัฒน์, ลลี เอื้อวิโลจิตร และ วีระวัฒน์ แช่มปรีดา. 2555. "เอนไซม์สำหรับย่อยวัตถุดิบจากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลโดยไม่ใช้ความร้อน." รายงานการวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

BacMap. 2015. Clostridium acetobutylicum ATCC 824. [Online] เข้าถึงได้จาก : http://bacmap.wishartlab.com/organisms/26

ChemSpider. 2015. n-butanol. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.258.html

Kiyoshi Keiji, Furukawa Masataka, Seyama Tomoko, Kadokura Toshimori, Nakazato Atsumi and Nakayama Shunichi. 2015. "Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoper butylacetonicum*." Bioresource Technology 186 : 325-328

Meesukanun Kritsada and Satirapipathkul Chutimon. 2014. "Production of Acetone-Butanol-Ethanol from Cassava Rhizome Hydrolysate by *Clostridium Saccharobutylicum* BAA 117." Chemical Engineering 37 : 421-426

Noomtima Piyoungkoon and Cheirsilp Benjamas. 2011. "Production of Butanol from

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Palm Empty Fruit Bunches Hydrolyzate by *Clostridium acetobutylicum*." Biotechnology 9 : 140-146

Ponthein Watchara and Cheirsilp Benjamas. 2011. "Development of Acetone Butanol Ethanol (ABE) Production from Palm Pressed Fiber by Mixed Culture of *Clostridium* sp. and *Bacillus* sp." Energy Procedia 9 : 459–467

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้