

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้
กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอล
ISOLATION OF ANAEROBIC BACTERIA FOR BUTANOL
PRODUCTION FROM GLYCEROL



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2560
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF ANAEROBIC BACTERIA FOR BUTANOL
PRODUCTION FROM GLYCEROL



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT
FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2017
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอล Isolation of anaerobic bacteria for butanol production from glycerol
ชื่อนักศึกษา	นายก้องกิตติกร ถือความสัตย์ รหัสนักศึกษา 57050669 นางสาวปัทมา เพ็ญวอยู่ รหัสนักศึกษา 57050722
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นตาม โดยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ดีของจุลินทรีย์ซึ่งมีปริมาณมากและสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้ งานวิจัยนี้สนใจทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนซึ่งสามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอล โดยคัดแยกจุลินทรีย์จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร 6 ชนิด ได้แก่ กล้วย มะม่วง ถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนได้ทั้งหมด 271 ไอโซเลท จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี พื้นผิว รูปร่าง และลักษณะขอบโคโลนี เป็นต้น แต่มีเพียง 133 ไอโซเลท ที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) และสร้างสปอร์ จากนั้นนำไปทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) โดยการเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลและอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคสในสภาวะไร้ออกซิเจน และนำไปหาปริมาณตัวทำละลายที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง HPLC พบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลทั้งหมด 9 ไอโซเลท โดยไอโซเลท C22 C13 และ B21 สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด คือ 2.50 กรัมต่อลิตร 2.37 กรัมต่อลิตร และ 1.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยอะซิโตนและเอทานอลที่ผลิตได้จากไอโซเลท C22 คือ 0.49 กรัมต่อลิตร และ 4.51 กรัมต่อลิตร C13 คือ 0.97 กรัมต่อลิตร และ

เอทานอล 3.72 กรัมต่อลิตร และ B21 คือ 0.42 กรัมต่อลิตร และ 4.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษารหัส
ไม่ลักษณะฟีโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเมื่อศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ด้วยการทดสอบใช้

ทางชีวเคมี (Biochemical test) พบว่า เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มีความสามารถในการเคลื่อนที่ แต่ไม่มี
ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase ไม่มีความสามารถในการย่อยเจลาติน ไม่มีความสามารถ
ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยสามารถใช้
กลูโคส แมนโนส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส และกลีเซอรอลได้ ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อ
Clostridium sp.

คำสำคัญ : การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน, บิวทานอล, กลีเซอรอล, *Clostridium* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Isolation of anaerobic bacteria for butanol production from glycerol
Students	Mr. Kongkidakorn Tuekhwansat Student ID 57050669 Miss Papitchaya Piewyoo Student ID 57050722
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong , Ph.D

Abstract

Glycerol is a by-product of biodiesel production. Nowadays, there is increasing tendency to produce biodiesel, as a result, the amount of glycerol has been increasing accordingly. Glycerol is a good carbon source and could be use as a substrate for industrial fermentation. This study interested in the isolation of anaerobic bacteria for butanol production from glycerol. Six agricultural were collected soil samples form fields of banana, mango, wing bean, rubber, cassava and longan. There are 271 isolates were screened with different colony morphology such as color, surface, shape and margin. Eventhough, merely 133 isolates were gram-positive, rod-shaped and spore-forming. To examine the potential of acetone-butanol-ethanol production, these 133 isolates were cultured in T6 medium utilized glycerol or glucose as a carbon source under anaerobic condition. After HPLC analysis, only 9 isolates could produce butanol from glycerol. The isolates C22, C13 and B21 could produce the highest butanol concentrations of 2.50, 2.37 and 1.76 g/L, respectively. Additionally, the concentrations of acetone and ethanol could be obtained from isolates C22 (0.49 and 4.51 g/L), C13 (0.97 and 3.72 g/L) and B21 (0.42 and 4.63 g/L). Phenotypic characterization by biochemical tests was studied and the results showed that each isolate could be motile but couldn't produce catalase, gelatinase and

amylase. All 3 isolates have been able to utilize carbon sources, such as glucose,
 เอกสารที่เผยแพร่ในช่องทางนี้ยังคงมีลิขสิทธิ์ของเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mannose, cellobiose, lactose, maltose and glycerol. Consequently, each isolate was similar to *Clostridium* sp.

Keywords: Isolation of anaerobic bacteria, butanol, glycerol, *Clostridium* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่ได้สละเวลาในการให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการศึกษา อีกทั้งยังคอยติดตามสอบถามถึงความคืบหน้าเพื่อให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ ตลอดจนผศ.ลินจง สุขล้าภู และรศ.ดวงใจ โอชัยกุล ซึ่งเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษฉบับนี้ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ทางผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ต่างๆ ที่ไม่ได้เอ่ยนาม ที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้ทางด้าน วิชาการแก่ผู้จัดทำ รวมทั้งได้แต่งตำราให้ผู้จัดทำได้ใช้ค้นคว้า อ้างอิง จนทำให้รายงานฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณคุณเสนห์ วงษ์รุ่งเรือง และคุณลุงพินิจ ย่างทัด ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บตัวอย่างดินที่สวนในจังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดจันทบุรี ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้ได้มี แหล่งตัวอย่างในการเริ่มต้นทำการวิจัยจนศึกษาได้สำเร็จ

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ รวมถึงบุคคลรอบข้างทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในเรื่องต่างๆเสมอมา และเข้าใจในสิ่งที่เป็นอุปสรรคที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาจนโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

หากโครงการพิเศษฉบับนี้ทำให้เกิดประโยชน์แก่ครู อาจารย์ บุคลากรทางการศึกษาและผู้สนใจศึกษาค้นคว้าความรู้ทั่วไป ขอขอบคุณงามความดีอันพึงมีในครั้งนี้แด่ครอบครัว ครูอาจารย์ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู และประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆแก่ผู้จัดทำ จนทำให้ผู้จัดทำมีความรู้ความสามารถที่จะดำเนินการจัดทำโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นผลสำเร็จ

ก้องกิตากร ถือความสัตย์
ปพิชญา เพ็ญอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 บิวทานอล	3
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของบิวทานอล.....	3
2.1.2 คุณสมบัติของบิวทานอลในการเป็นสารเชื้อเพลิง.....	4
2.1.3 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้.....	6
2.1.4 การผลิตบิวทานอลจากการสังเคราะห์ทางเคมี.....	6
2.1.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก.....	7
2.2 กลีเซอรอล (glycerol).....	8
2.2.1 คุณสมบัติของกลีเซอรอล.....	8
2.2.2 การสังเคราะห์กลีเซอรอล.....	10
2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลโดยใช้กลีเซอรอล.....	12
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของ <i>Clostridium</i> sp.....	12
2.3.2 <i>Clostridium pasteurianum</i>	14
2.3.3 <i>Clostridium diolis</i>	15
2.4 การทดสอบทางชีวเคมี.....	16
2.4.1 การใช้แป้งหรือน้ำตาลในการเจริญเติบโต.....	16
2.4.2 การทดสอบหาเอนไซม์ชนิดอื่นๆ.....	17
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 17
 "ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้"

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	20
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	20
3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	20
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	20
3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	21
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน.....	21
3.2.2 การตัดแยกเชื้อแบคทีเรีย.....	22
3.2.3 การทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล.....	22
3.2.4 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อที่ตัดแยกได้ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test).....	22
3.3 การวิเคราะห์ผลการวิจัย.....	24
3.3.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล.....	24
3.3.2 วิเคราะห์ทางสถิติ.....	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	26
4.1 การตัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากกลีเซอรอล.....	26
4.2 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อที่ตัดแยกได้ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test).....	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	33
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	33
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	34
เอกสารอ้างอิง.....	35
ภาคผนวก.....	39
ภาคผนวก ก.....	40
ภาคผนวก ข.....	43
ภาคผนวก ค.....	51
ภาคผนวก ง.....	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล	4
2.2 คุณสมบัติของบิวทานอลเทียบกับแก๊สโซลีน เอทานอล และเมทานอล	5
2.3 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล	9
2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	9
4.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร โดยใช้อาหาร RCM และ NA บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	26
4.2 ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล เปรียบเทียบกับอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	28
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท C22 C13 และ B21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	30
4.4 ลักษณะพีโนไทป์ของไอโซเลท B21 C13 C22 และ <i>Clostridium diolis</i> จากการทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับลักษณะพีโนไทป์ของ <i>C. pasteurianum</i> และ <i>C. diolis</i> จาก Bergy's manual of Systematic.....	32
ข.1 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8 x 150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	44
ข.2 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8 x 150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	46
ข.3 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8 x 150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที.....	48
ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ค.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	52
ค.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	54



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 สูตรโครงสร้างของบิวทานอล.....	3
2.2 วิธีการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (a) Oxo synthesis, (b) Reppe process, และ (c) Crotonaldehyde hydrogenation.....	7
2.3 สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์.....	8
2.4 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล.....	9
2.5 กลไกการหมักกลีเซอรอลของเชื้อ <i>C. pasteurianum</i>	14
2.6 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ <i>C. pasteurianum</i>	15
4.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของไอโซเลท C22 ที่ปรากฏในอาหารแข็ง RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน	29
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟบิวทานอลต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก	45
ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก	47
ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตนซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟอะซิโตนต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก	49
ง.1 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22	56
ง.2 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Cellobilose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	57
ง.3 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป (ต่อ)

หน้า

ง.4 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	58
ง.5 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Lactose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	58
ง.6 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Mannose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	59
ง.7 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Maltose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	59
ง.8 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Xylose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	60
ง.9 การทดสอบความสามารถในการย่อยแบ่งของเชื้อ ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน.....	61
ง.10 การเคลื่อนที่ของเชื้อภายในหลอดอาหาร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22	62
ง.11 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาตินของเชื้อ หลังจากแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ <i>Clostridium diolis</i> หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 'ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้'

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

ง.12 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Catalase ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งรอยช้ำที่เห็นเป็นรอบช้ำจากการ smear เชื้อ ไม่ใช่ลักษณะของฟองก๊าซ	63
--	----



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันราคาน้ำมันโลกมีความผันผวนมาก และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี รัฐบาลในหลายประเทศ จึงมีนโยบายสนับสนุนพลังงานทดแทนซึ่งรวมถึงเชื้อเพลิงชีวภาพชนิดต่างๆที่เป็นพลังงานทางเลือกมากขึ้น ทำให้มีความสนใจที่จะนำบิวทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงแทนพลังงานจากปิโตรเลียมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานต้นทุนหมุนเวียน มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับน้ำมันมากกว่าเอทานอล ทำให้สามารถผสมกับน้ำมันได้ดีกว่า ให้ค่าพลังงานและมีจุดเดือดสูงกว่า (Huber และคณะ, 2006) ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์ โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใดๆต่อเครื่องยนต์ เช่นเดียวกับการใช้น้ำมันอีกด้วย นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย โดยสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกและอุตสาหกรรมการผลิตสารให้กลิ่นรสได้อีกด้วย (Campos และคณะ, 2002) ดังนั้น ในปัจจุบันนี้นักวิจัยส่วนใหญ่จึงหันมาให้ความสนใจกับการศึกษากระบวนการผลิตบิวทานอลมากขึ้น

กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะมีการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นตาม หากมีการแปรรูปผลพลอยได้ให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม จะช่วยให้โรงงานผู้ผลิตได้กำไรเพิ่มขึ้นและลดต้นทุนในการกำจัดกระบวนการผลิตไบโอดีเซลในรูปเมทิลเอสเทอร์จะใช้น้ำมัน เช่น น้ำมันพืช น้ำมันจากสัตว์ และน้ำมันปรุงอาหารที่ผ่านการใช้แล้ว โดยวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด จะผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมี คือ ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำ โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นเบส กรด หรือเอนไซม์ (Fukuda และคณะ, 2001) และในปฏิกิริยาจะมีกลีเซอรอลเกิดเป็นผลพลอยได้เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 10 ดังนั้นจึงต้องกำจัดกลีเซอรอลดิบ หากไม่มีการนำไปใช้หรือการจัดการที่ดีอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ จึงต้องมีการหาแนวทางการเปลี่ยนกลีเซอรอลดิบเป็นสารเคมีต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่า

กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่ดีของจุลินทรีย์ซึ่งมีปริมาณมากและสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้ (Da Silva และคณะ, 2009) มีการศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 จากของเสียที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรและกรดแลคติกที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5-7 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 6.2-7.2 กรัมต่อลิตร (Jae และคณะ, 2011) *Lactobacillus* และ *Clostridium* บางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเพื่อผลิต 1,3-propanediol (Forsberg, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่า *Clostridium pasteurianum* สามารถผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอล พบว่ามีการผลิตบิวทานอลสูงถึง 17 กรัมต่อลิตร สำหรับ

Clostridium pasteurianum DSM525 ในกระบวนการหมักแบบ batch (Biebl, 2001) และสูงถึง 17.8 กรัมต่อลิตร โดย *Clostridium pasteurianum* สายพันธุ์กลาย (Malaviya และคณะ, 2012) กลีเซอรอลถูกนำมาใช้ในการหมักด้วย *Clostridium acetobutylicum* 2 สายพันธุ์ ได้บิวทานอล สูงถึง 6.6 และ 8.6 กรัมต่อลิตร (Andrade และคณะ, 2003) เมื่อ Panitz และคณะ (2014) คัดแยกเชื้อ *Clostridium tetanomorphum* สายพันธุ์ GT6 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร RCM ที่มีกลีเซอรอล 2.5% พบว่ามีเพียงบิวทานอลและเอทานอลเท่านั้นที่ถูกผลิตหลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.5 กรัมต่อลิตร และการเจริญเติบโตของเชื้อไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงถึง 15%

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะมุ่งเน้นการคัดแยกแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอลได้ โดยคัดแยกจากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร เพราะอากาศไม่สามารถแทรกผ่านลงไปในพื้นที่ดินที่มีความลึกได้ เนื่องจากต้องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต รวมถึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่คัดแยกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอล จากแหล่งดินเพาะปลูกทางการเกษตร และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร 6 ชนิด คือ กล้วย มะม่วง ในจังหวัดสมุทรปราการ ถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย ในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) และ Nutrient agar (NA) คัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเทียบกับกลูโคส และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส การทำงานของเอนไซม์ catalase การเคลื่อนที่ และการย่อยเจลาติน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอลได้
2. เป็นแนวทางในการพัฒนางานวิจัยเรื่องนี้ในขั้นต่อไป คือ การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการขยายขนาดการผลิตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล

บิวทานอล (1-butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของ Butyl alcohol, n-butanol หรือ Methylolpropane เป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล C_4H_9OH มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 g/mol โดยมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของบิวทานอล

ที่มา : <http://www.gcsescience.com/o38.htm> (วันที่สืบค้น 2 พฤษภาคม 2561)

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไปของบิวทานอล

บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ไวไฟ ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัวซึ่งคล้ายๆ กลิ่นของกล้วย แต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามบิวทานอลสามารถ ทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้อาจก่อให้เกิดการเสพติดได้เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูงๆ บิวทานอลสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี แต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ (Lee และคณะ, 2008 และ Durre, 2008) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์ เช่นเดียวกับบิวทานอล ได้แก่ เมทานอล (1 คาร์บอน) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Kristin, 2007) โดยสรุปคุณลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอลดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล
จุดหลอมเหลว (°C)	-89.3
ความถ่วงจำเพาะ	0.810–0.812
จุดติดไฟ (°C)	35-37
จุดลุกติดไฟได้เอง (°C)	343-345
จุดวาบไฟ (°C)	25-29
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (น้ำ: 1.0)	0.81
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (°C)	287
ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของก๊าซหรือไอระเหย (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในอากาศ)	1.4-11.3
การละลายได้ในน้ำ 9.0 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตร	(7.7 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 20°C)
ความหนาแน่นไอสัมพัทธ์ (อากาศ: 1.0)	2.6
ความดันไอ (kPa ที่ 20 °C)	0.58

ที่มา : Devis และ Morton III (2008) และ Lee และคณะ (2008)

2.1.2 คุณสมบัติของบิวทานอลในการเป็นสารเชื้อเพลิง

จุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่เหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Hansen และคณะ, 2005 และ Niven, 2005) ทั้งนี้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงใดๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก (Huber และคณะ, 2006) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างบิวทานอลกับเอทานอล ตามตารางที่ 2.2 จะเห็นได้ว่าบิวทานอลมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธิ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนได้ในอัตราส่วนต่างๆ ได้ (Lee และคณะ, 2008) ในทางตรงกันข้ามเอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้บางส่วนเท่านั้น เช่น ในประเทศบราซิลได้มีการใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนแค่ 23% นอกจากนี้ ในแถบทวีปยุโรปบางประเทศ รวมทั้งประเทศสหรัฐอเมริกา จะใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนเพียง 10% เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใดๆต่อไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องยนต์เลย รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย นอกจากนี้ การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสม พบว่า ไอเสียที่ออกมาปลอดจาก แก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนโตรสออกไซด์ที่เป็นพิษ ซึ่งเป็นมิตรอย่างมากต่อสภาพแวดล้อมเมื่อเทียบกับการใช้เอทานอล

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติของบิวทานอลเทียบกับแก๊สโซลีน เอทานอล และเมทานอล

	บิวทานอล	แก๊สโซลีน	เอทานอล	เมทานอล
จุดเดือด (°C)	117-118	27-221	78	64.7
ความหนาแน่นที่ 20 °C (กรัม/มิลลิลิตร)	0.8098	0.7-0.8	0.7851	0.7866
การละลายในน้ำ 100 กรัม	ผสมไม่เป็น	ผสมไม่เป็น	ผสมไม่เป็น	ผสมไม่เป็น
	เนื้อเดียวกัน	เนื้อเดียวกัน	เนื้อเดียวกัน	เนื้อเดียวกัน
ความหนาแน่นของพลังงาน (MJ.l-1)	27-29.2	32	19.6	16
ปริมาณความร้อนและค่าพลังงาน (BTU/gal)	110000	115000	84000	76000
อัตราส่วนผสมของอากาศกับเชื้อเพลิง	11.2	14.6	9	6.5
ความร้อนที่ต้องการเพื่อระเหยสารที่จุดเดือด	0.43	0.36	0.92	1.2
ปกติ (MJ/Kg)				
ความจุความร้อน (Cp) ที่ STP (kJ/k-mol.K)	178	160-300	112.3	81.14
Research octane number	96	91-99	129	136
Motor octane number	78	81-89	102	104
สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำ และชั้นออกทานอล ($\log P_{o/w}$) ^a	0.88	3.52±0.62	-0.31	-0.77
Dipole moment (การมีขั้ว)	1.66	ไม่มีข้อมูล	1.7	1.6
ความหนืด (10-3 Pa.s)	2.593	0.24-0.32	1.078	0.5445

หมายเหตุ: ^aLog P เป็นตัวชี้วัดการไม่ชอบน้ำ และการมีขั้ว สำหรับแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ในน้ำมัน เบนซิน และ Log P เป็นค่าประมาณค่าเฉลี่ยน้ำหนักของส่วนประกอบหลัก
ที่มา : Hansch และคณะ (1995)

คุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ได้แก่ บิวทานอลระเหยกลายเป็นไอ ได้ต่ำกว่า โดยมีค่า Reid value ต่ำกว่าเอทานอลถึง 7 เท่า และบิวทานอลยังมีความสามารถในการกักกรองนํ้า จึงทำให้ปลอดภัยต่อการขนส่งลำเลียง ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลมีความดันไอต่ำ มีค่าออกเทนที่สูงจึงสามารถนำไปผสมเข้ากับแก๊สโซลีนและน้ำมันดีเซลได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุดังกล่าวนี้ จึงทำให้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งลำเลียงด้วยระบบท่อ ไปยังสถานีจ่ายได้ (Lee และคณะ, 2008) ในขณะที่เอทานอลไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้ การค้าไม่เนื่องจากมีค่าความดันไอสูง นอกจากนี้ บิวทานอลยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่สามารถผสมใช้

เข้ากับแก๊สโซลีนได้ดีกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีความหนืดเป็น 2 เท่าของเอทานอลและประมาณ 5-7 เท่า ของแก๊สโซลีน (Wackett, 2008) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอล เช่น ความหนาแน่น และความจุความร้อน มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 2.2

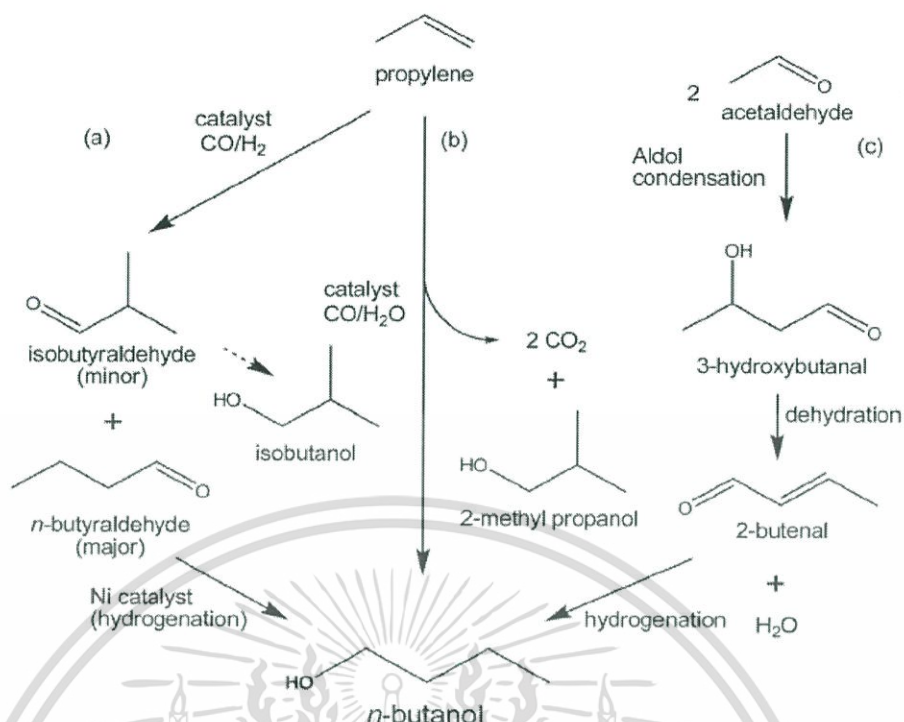
2.1.3 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้บิวทานอลและสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทา อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลั่นรสได้อีกด้วย (Lee และคณะ, 2008 และ Durre, 2008)

2.1.4 การผลิตบิวทานอลจากการสังเคราะห์ทางเคมี

บิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมนั้น ส่วนใหญ่จะผลิตจากกระบวนการทางเคมี 3 กระบวนการ ได้แก่ Oxo process, Reppe process และ Crotonaldehyde hydrogenation ดังรูปที่ 2.2 ในการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Oxo (Hydroformylation) นั้นต้องมีการเติม Carbon monoxide และ Hydrogen เพื่อเข้าไปแทนที่หมู่ Hydrocarbonyl อย่างต่อเนื่อง โดยมีโลหะจำพวก Co, Rh, หรือ Ru เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง Aldehyde ที่เกิดขึ้นในระยะแรก จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นบิวทานอลในกระบวนการ hydrogenation ต่อไป ทั้งนี้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับความดัน อุณหภูมิ และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย โดยบิวทานอลที่ได้จากปฏิกิริยานี้จะได้ Isomer ที่แตกต่างกันหลายชนิด ส่วนการสังเคราะห์บิวทานอลผ่านกระบวนการ Reppe จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันของ Propylene, Carbon monoxide และน้ำ ในขณะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมอยู่ด้วย (Bochman และคณะ, 1999) ซึ่งจะทำให้เกิดของผสมของ n-butanaldehyde และ Isobutanaldehyde ต่อมาจะถูกลดรูปให้เปลี่ยนเป็น บิวทานอล (Wackett, 2008) การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Reppe นี้ จะทำให้ได้บิวทานอลโดยตรง ไม่ผ่านตัวกลาง ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิและความดันต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 วิธีการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (a) Oxo synthesis, (b) Reppe process, และ (c) Crotonaldehyde hydrogenation

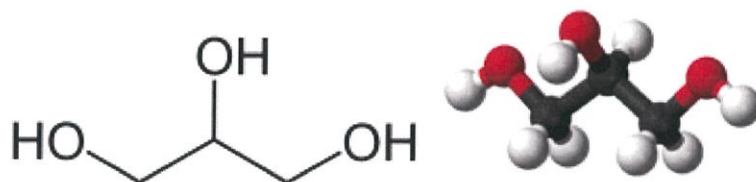
ที่มา : Lee และคณะ (2008) และ Wackett (2008)

แต่อย่างไรก็ตามการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีนี้ ไม่สามารถผลิตได้ในเชิงการค้า เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัยซึ่งมีราคาแพง จนกระทั่งเมื่อสิบปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตบิวทานอลจาก Acetaldehyde ผ่านกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation ที่ประกอบไปด้วยขั้นตอน Aldol condensation, Dehydration และ Hydrogenation (Bochman และคณะ, 1999) แม้ว่าจะยังคงมีการใช้วิธีนี้ ในการผลิตบิวทานอลไม่มากนัก แต่ในอนาคตอันใกล้นี้ การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation นี้ อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญก็ได้ เนื่องจาก Crotonaldehyde สามารถผลิตได้จากเอทานอล โดยกระบวนการ Dehydrogenation ทั้งนี้เอทานอลสามารถผลิตได้จากสารชีวมวลโดยกระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งการผลิตบิวทานอลโดยการสังเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีอื่นๆ ต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้น ที่มาจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม ซึ่งนับวันยิ่งจะหายากและลดน้อยลง

2.1.5 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก (อังคณาและคณะ, 2553)

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตเอซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล ทั้งนี้ เอบีอีเป็นกระบวนการที่รู้จักกันดี และเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตเอซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจ
“ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้”



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol> (วันที่สืบค้น 9 พฤษภาคม 2561)

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล

ชื่อ IUPAC	Propane-1,2,3-triol
ชื่อทั่วไป	Glycerin Glycerine Propanetriol 1,2,3-Trihydroxypropane 1,2,3-Propanetriol
สูตรโมเลกุล	$C_3H_8O_3$

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol> (วันที่สืบค้น 9 พฤษภาคม 2561)

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
สถานะ	ของเหลวหนืด
สี	ใส ไม่มีสี
มวลโมเลกุล	92.10 กรัมต่อโมล
ความหนืด	1.5 ปาสคาล วินาที
ความหนาแน่น	1.261 กรัมต่อมิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด ต่าง (pH)	5.0 ที่ 20 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	290 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	17.8 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	1.28 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ที่มา : วรรัตน์ (2553) เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

2.2.2.1. กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ (by product) ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรืออุตสาหกรรมน้ำมัน (วรารัตน์, 2553)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลในปัจจุบัน เกิดจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ไขมันรวมไปถึงน้ำมันที่ผ่านการใช้งานหรือน้ำมันที่เหลือทิ้งจากครัวเรือนจะได้กลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ร่วมด้วย ประมาณร้อยละ 10 ของผลผลิตทั้งหมด กลีเซอรอลที่ได้มีสิ่งต่างๆ เจือปนอยู่ด้วยโดยมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีค่าความเป็นกรดต่างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ความบริสุทธิ์ของกลีเซอรอลจะขึ้นอยู่กับความสะอาดของวัตถุดิบที่ใช้ในระหว่างการผลิตไบโอดีเซล กระบวนการแยกระหว่างไบโอดีเซลกับกลีเซอรอลและตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ส่วนใหญ่มักจะใช้ตัวเร่งที่เป็นเฟสเดียวกับสารตั้งต้น (homogeneous catalyst) และมีคุณสมบัติเป็นด่าง เนื่องจากให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงละใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาน้อยกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรด เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ทำให้กลีเซอรอลที่แยกออกมาจากไบโอดีเซลนั้นมีตัวเร่งปฏิกิริยา สบู่ (เกิดจากตัวเร่งปฏิกิริยาทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระในน้ำมัน) เมทานอล วิตามิน น้ำ และไบโอดีเซลบางส่วนเจือปนอยู่ด้วย อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการใช้ตัวเร่งที่เป็นของแข็งหรือเอนไซม์ ซึ่งมีเฟสแตกต่างจากสารตั้งต้น (heterogeneous catalyst) กลีเซอรอลดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลก็ยังคงไม่บริสุทธิ์ เนื่องจากสารอื่นๆที่ปนมากับน้ำมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้น กลีเซอรอลดิบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลมีความบริสุทธิ์ต่ำ ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยตรงและมีราคาค่อนข้างต่ำ จึงจำเป็นที่จะต้องหาทางออกเพื่อลดปริมาณกลีเซอรอล ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และการแสวงหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลดิบไม่เพียงแต่เป็นการเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล แต่ยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตไบโอดีเซลอีกด้วย

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ ที่เกิดจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย เนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ แต่กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆนั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่ หรือแม้กระทั่งการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงควรทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล

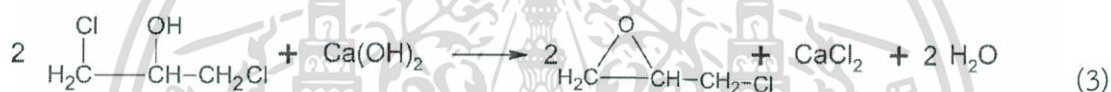
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2. กระบวนการทางเคมี (Myers, 2007)

การสังเคราะห์กลีเซอรอลจากกระบวนการทางเคมี ซึ่งสังเคราะห์มาจากโพรไพลีน (propylene) นั้นเริ่มจากการที่คลอรีนเข้าแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมของโพรไพลีน ได้เป็นสารอัลลิลคลอไรด์ (allyl chloride) ตามสมการที่ 1 จากนั้นทำปฏิกิริยากับกรดไฮโปคลอรัสจะได้เป็น 1,3 ไดคลอโรไฮดริน (1,3 dichlorohydrin) ดังสมการที่ 2



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



ปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายนั้นอีพิคลอโรไฮดรินจะถูกไฮโดรไลส์ไปเป็น กลีเซอรอลด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมคาร์บอเนต ดังสมการที่ 4



2.2.2.3. กระบวนการทางชีวภาพ

มีการศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ดังนี้ Benito และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดยสภาวะการหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเพคเบด (pack bed) โดยใช้การตรึงเซลล์ของยีสต์ *Saccharomuces cerevisiae* สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ ความเข้มข้นสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิต 36.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 6.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhugue และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกลีเซอรอลโดย *Candida glycerinogenes* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมติกสูง ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างกลีเซอรอล คือ ที่อุณหภูมิ 29-33 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 4-6 โดยอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตกลีเซอรอลประกอบไปด้วยกลูโคส 230-250 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร และน้ำแซ่ข้าวโพด 5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในมีฟอสเฟต 55-65 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า มีผลได้ของกลีเซอรอลสูงสุดเป็นร้อยละ 64.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงสุดเป็น 137 กรัมต่อลิตร

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

2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอลโดยใช้กลีเซอรอล

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของ *Clostridium* sp.

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

2.3.1.1 สันฐานวิทยาและสรีรวิทยา

Clostridium เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 มิลลิเมตร และกว้าง 0.4-1.2 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาวะที่เหมาะสม คือ สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สปอร์ทนความร้อนได้ สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 10-15 นาที การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงใน Blood agar และ Egg yolk agar ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจาก Blood agar สามารถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ส่วนลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญใน egg yolk agar สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lecithinase โดยดูจากลักษณะตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ lipase โดยดูจากความเป็นเงาที่ผิวหน้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2 อนุกรมวิธาน

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

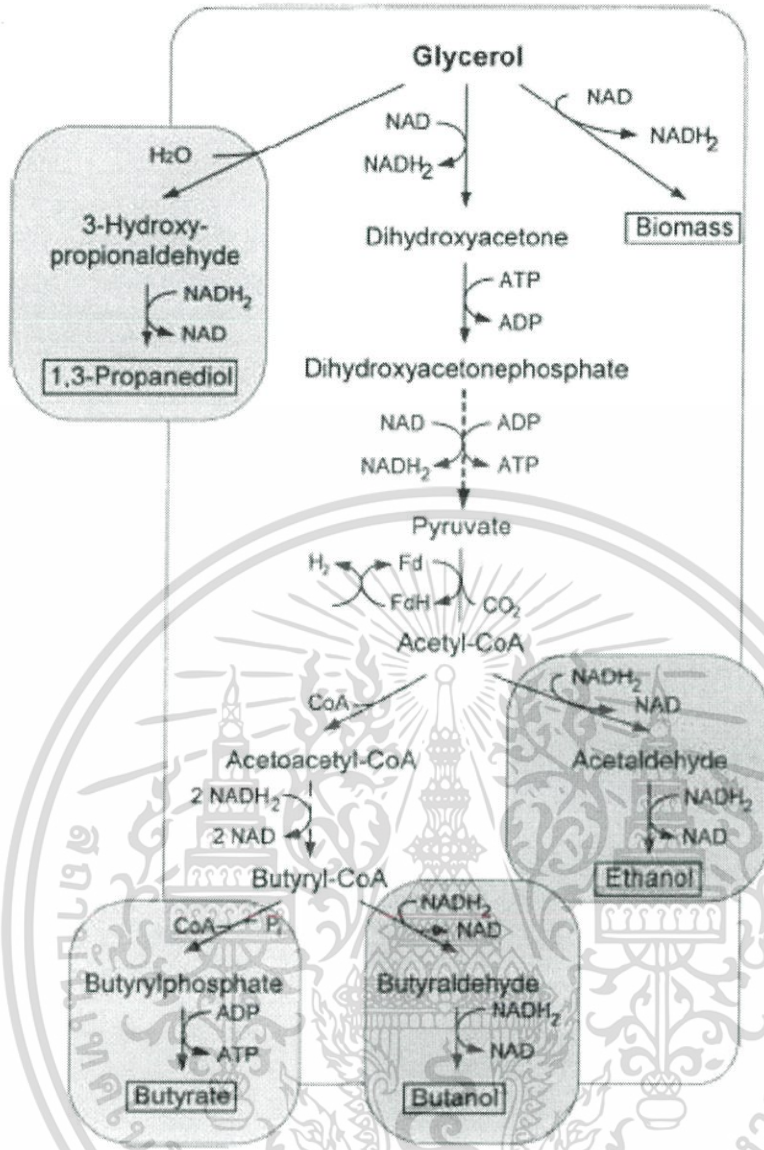
ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/Clostridium_botulinum (วันที่สืบค้น 9 พฤษภาคม 2561)

2.3.1.3 ชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

ไบโอบิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol fermentation) หรือเรียกว่า การหมัก ABE ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้ โดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่นิยมใช้มากที่สุดซึ่งสามารถคัดแยกได้จากหลากหลายแหล่ง ปัจจุบันแบคทีเรียในสกุลนี้ที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. pasteurianum* แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) แลคโทส (Lactose) ซิโลส (Xylose) ซิเลน (Xylan) แป้ง และกลีเซอรอล (Andrade และ Vasconcelos, 2003; Mitchell, 1998) โดยแหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีอยู่หรือสามารถผลิตได้จากชีวมวลที่มีอยู่หลากหลายและมากมาย

มีการศึกษาการหมักกลีเซอรอลด้วยเชื้อ *Clostridium pasteurianum* โดยศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์ตามสภาวะการเพาะเลี้ยง ในการหมักแบบ batch ส่วนใหญ่บิวทานอลจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมัก นอกจากนั้นกลีเซอรอลยังถูกเปลี่ยนเป็น 1,3-โพรเพนไดออล กรดบิวทิริก กรดอะซิติก และเอทานอล ซึ่งจากผลการทดลอง บิวทานอลไม่ได้ถูกผลิตตั้งแต่แรก แต่จะผลิตหลังจากกรดบิวทิริก กรดอะซิติก และ 1,3-โพรเพนไดออล เท่านั้น (Biebl, 2001) โดยกลไกการหมักแสดงในรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 กลไกการหมักกลีเซอรอลของเชื้อ *Clostridium pasteurianum*
ที่มา : Biebl (2001)

2.3.2 *Clostridium pasteurianum*

Clostridium pasteurianum ก่อนหน้านี้รู้จักกันในชื่อ *Clostridium pastorianum* เป็นแบคทีเรียที่ค้นพบในปี ค.ศ. 1890 โดยนักจุลชีววิทยาของรัสเซีย Sergei Winogradsky ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนอิสระจากบรรยากาศในกระบวนการ metabolic

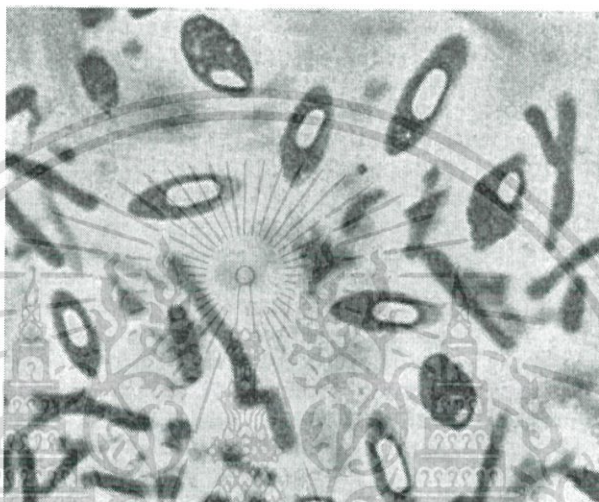
Clostridium pasteurianum เป็นผู้ผลิตกรดอะมิโนที่รู้จักกันดี มีความสามารถในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นบิวทิลอะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนโมเลกุลผ่านกระบวนการหมัก คล้ายคลึงกับ *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium pasteurianum* ยังมีความสามารถในการเปลี่ยนจากการผลิตกรดไปเป็นตัวทำละลายภายใต้สภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรรเรียนเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดได้เห็นไปเผยแพร่โดยไม่มีการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญเติบโตบางชนิด แม้กระนั้นก็ยังไม่ชัดเจนว่าจะมีการเติบโตที่แสดงให้เห็นว่ามีการผลิตตัวทำละลายที่ดี มันเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดิน และเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน

2.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

C. pasteurianum เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีขนาด 0.9-1.7 ไมโครเมตร x 3.5- 4.7 ไมโครเมตร สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ 1.5 และ 2.0 ไมครอน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา แสดงในรูปแบบที่ 2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.6 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Clostridium pasteurianum*

ที่มา : <https://nurlaelahjamil.wordpress.com/2013/12/31/bakteri-penambat-nitrogen-2-clostridium-pasteurianum/> (วันที่สืบค้น 2 พฤษภาคม 2561)

เนื่องจากความสามารถในใช้นิโตรเจนในอากาศ แบคทีเรียเหล่านี้ส่งผลต่อมูลค่าทางเศรษฐกิจของพื้นที่เพาะปลูก คือกระบวนการของการลดไนเตรตเพื่อให้เกิดก๊าซไนโตรเจน (N_2) เพื่อให้วงจรไนโตรเจนสมบูรณ์ กระบวนการนี้ดำเนินการโดยแบคทีเรีย *C. pasteurianum* ภายใต้สภาวะไร้อากาศ โดยใช้นิเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนในระหว่างการหายใจ กระบวนการ denitrification สมบูรณ์สามารถแสดงเป็นปฏิกิริยา redox ดังสมการที่ 5



2.3.3 *Clostridium diolis*

Clostridium diolis มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันกับ *C. butyricum* และ

C. beijerinckii เซลล์มีขนาด 0.7-1.7 x 1.2-8 m อยู่เป็นเดี่ยวหรือเป็นคู่ สปอร์เป็นรูปไข่ (Oval)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 “ไม่ว่าใครเห็นได้” ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุที่แสดงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงชื่อของเอกสารที่ผู้จัดทำงานนี้ใช้

ในช่วง 5.5–8.5 pH ที่เหมาะสม คือ 7.0 เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส

มีความหลากหลายในการหมักคาร์โบไฮเดรตรวมถึงอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคส, ฟรุคโตส, เซลโลไบโอส, แล็กโตส, กาแลกโตส, ทรีฮาโลส, โซโลส, โกลโคเจน, แมนนิทอล และ กลีเซอรอล (Biebl, 2002)

2.4 การทดสอบทางชีวเคมี

ภายหลังการแยกเชื้อแบคทีเรียให้ได้แบคทีเรียที่ไม่มีสายพันธุ์อื่นปนแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด โดยเริ่มต้นจากการดูลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างของเซลล์ การสร้างสปอร์ ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสายพันธุ์ (species) ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะในการสร้างเอนไซม์และเมทาบอลิซึมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยสามารถแบ่งการทดสอบคุณสมบัติการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

2.4.1 การใช้แป้งหรือน้ำตาลในการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียต้องการสารอาหารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ที่แบคทีเรียนำไปประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นโมเลกุลที่มาประกอบเป็นส่วนต่างๆ ของเซลล์ สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ตามคุณสมบัติหรือความสามารถในการใช้สารอาหารประเภทต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ การทดสอบการใช้น้ำตาลหรือสารอินทรีย์อื่นๆ เพื่อการเจริญเติบโตจึงเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่นำมาใช้เพื่อจำแนกได้

2.4.1.1 การหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ (carbohydrate fermentation test)

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเอนไซม์ที่มีอยู่ในแบคทีเรานั้นๆ แบคทีเรียบางชนิดสามารถหมักน้ำตาล เช่น กลูโคสได้ในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobically) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดหรือสารละลายต่างๆ รวมทั้งก๊าซ โดยในการทดสอบจึงใช้ pH indicator ผสมในอาหารที่ใช้ทดสอบเพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เช่น อาหารทดสอบที่มีฟีนอลเรดเป็น pH indicator จะเปลี่ยนสีของอาหารจากสีส้มเป็นสีเหลืองในสภาวะที่เป็นกรด และจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูในสภาวะที่เป็นด่าง การทดสอบการหมักน้ำตาลหากมีก๊าซเกิดขึ้นจะพบก๊าซในอาหาร (ช่องว่าง) หรือใน Durham tube ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ต่างกันทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายจากการย่อยแตกต่างกันซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียที่นำมาจำแนกเชื้อได้ (Cappuccino และ Sherman, 2001)

2.4.2 การทดสอบหาเอนไซม์ชนิดอื่นๆ

การสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียเป็นคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย ซึ่งใช้ในการจำแนกแบคทีเรียได้

2.4.2.1 การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส (Catalase)

เป็นการตรวจหาเอนไซม์คาตาเลสในเชื้อแบคทีเรียโดยเอนไซม์จากเชื้อจะสลาย H_2O_2 ได้เป็นน้ำกับออกซิเจนดังสมการเกิดเป็นฟองก๊าซให้เห็นได้ ดังสมการที่ 6 สามารถทดสอบโดยใช้ 3% hydrogen peroxide (Cappuccino และ Sherman, 2001)



2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Panitz และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนในแหล่งน้ำนิ่ง จากการวิเคราะห์ยีน 16S-rRNA พบว่าสายพันธุ์ GT6 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย *C. tetanomorphum* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับ *C. tetanomorphum* 4474(T) 99 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ GT6 มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลากหลายประกอบด้วย กลูโคส ฟรุกโตส มอลโทส โซโลส และกลีเซอรอล ในการผลิตบิวทานอล โดยไม่ผลิตอะซิโตน แต่ผลิตเอทานอล กรดบิวทิริก กรดอะซิติก และ 1,3-propanediol จากการเพาะเลี้ยง *C. tetanomorphum* สายพันธุ์ GT6 ในอาหาร RCM ที่มีกลีเซอรอล 3% พบว่ามีหลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.5 กรัมต่อลิตร และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 14 กรัมต่อลิตร และการเจริญเติบโตของเชื้อไม่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลสูงถึง 15%

Biebl (2001) ได้ทำการศึกษาการหมักกลีเซอรอลด้วยเชื้อ *Clostridium pasteurianum* โดยศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์ตามสภาวะการเพาะเลี้ยง ในการหมักแบบ batch ส่วนใหญ่บิวทานอลจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมัก นอกจากนั้นกลีเซอรอลยังถูกเปลี่ยนเป็น 1,3-โพรเพนไดออล กรดบิวทิริก กรดอะซิติก และเอทานอล กลีเซอรอลที่ถูกใช้มากกว่า 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ถึง 17 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลอง บิวทานอลไม่ได้ถูกผลิตตั้งแต่แรก แต่จะผลิตหลังจากกรดบิวทิริก กรดอะซิติก และ 1,3-โพรเพนไดออล เท่านั้น

Gallardo และคณะ (2017) ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตบิวทานอล และ 1,3-โพรเพนไดออล จากกลีเซอรอล โดยเชื้อ *Clostridium pasteurianum* สายพันธุ์กลาย พบว่าการเติมเหล็ก 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้การผลิตบิวทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 163% เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า และหัวข้อที่มีอายุเหมาะสมคือ 12 ชั่วโมง

ไม่วารณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sarchami และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการหมักกลีเซอรอลหยาบ ในถังหมักขนาด 7 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบ batch โดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 จากผลการทดลองนั้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้ผลผลิตบิวทานอลมากที่สุด คือ ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 50 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่ pH 6.8 และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยได้ผลผลิตบิวทานอล 34% ของโมลบิวทานอลต่อโมลกลีเซอรอล ดังนั้นกลีเซอรอลดิบจึงเป็นวัตถุดิบที่ดีสำหรับการผลิตบิวทานอล

Jae และคณะ (2011) ได้ศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 จากของเสียที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรและกรดแลคติก ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5-7 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 6.2-7.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งกรดแลคติกที่มีช่วยเป็นบัฟเฟอร์ รักษาค่าความเป็นกรดต่างให้อยู่ในช่วง 5.7-6.1

Andrade และคณะ (2003) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 และ ATCC 4259 ด้วยวิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous cultures) เป็นระยะเวลา 72 วัน ซึ่งใช้อาหารที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลและกลูโคส พบว่า สามารถผลิตบิวทานอลได้ 43-62 % (w/w) โดยได้ใช้กลีเซอรอลคุณภาพต่ำที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้กลีเซอรอลทั่วไป

Krasnan และคณะ (2018) ศึกษาการผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลของเชื้อ *Clostridium pasteurianum* ที่ถูกตรึงไว้ในอนุภาคโพลีไวนิล แอลกอฮอล์ พบว่าในการหมักแบบกะซ้ำ (repeated batch fermentations) ระยะเวลาของการหมักลดลงจาก 19.5 ชั่วโมงเป็น 2.7 ชั่วโมง และผลิตบิวทานอลที่ได้เพิ่มขึ้น 6.3 เท่า (3.08กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบเซลล์อิสระ เมื่อใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และในกรณีใช้กลีเซอรอลที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซล สามารถผลิตบิวทานอลได้ 1.76-2.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Xin และคณะ (2017) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ CT7 โดยได้ปรับปรุงสภาวะในการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ซึ่งเชื้อสามารถใช้กลีเซอรอลเพื่อผลิตบิวทานอลได้ 16.6 กรัมต่อลิตร และผลได้ 0.43 กรัมต่อกรัม ด้วยวิธีการหมักแบบกะ (batch fermentation) และ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ CT7 ยังสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลหยาบเป็นบิวทานอลได้ 11.8 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการปรับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gallardo และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลหยาบต่อการผลิตบิวทานอลและ 1,3-โพรเพนไดออล โดยเชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลหยาบมากกว่า 35 กรัมต่อลิตร เชื้อมีผลได้ของบิวทานอลมากกว่าผลได้ของ 1,3-โพรเพนไดออล และการเติมอะซิเตทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ความเข้มข้นบิวทานอลเพิ่มขึ้นแต่ทำให้ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงมากขึ้น การเติมบิวทิเรตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ความเข้มข้นบิวทานอลเพิ่มขึ้น 45% และการผลิต 1,3 -โพรเพนไดออลลดลง และลดเวลาในกระบวนการเพาะเลี้ยงลง

อภิสัทธี (2010) ได้ศึกษาผลจากการใช้มันสำปะหลังและกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับยีสต์ที่ใช้แล้วในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ batch โดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากการทดลองพบว่า *C. acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิต ABE ได้เทียบเท่ากับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทดลองการหมักแบบ batch ที่ไม่มีการควบคุม pH สามารถผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 14.33 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสที่ผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 15.39 กรัมต่อลิตร ในกรณีที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก พบว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* JCM 7289 สามารถผลิตตัวทำละลายได้หลากหลาย เช่น บิวทานอล เอทานอล และอะซิโตน อย่างไรก็ตามกลีเซอรอลบางส่วนยังสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น 1,3 โพรเพนไดออล, กรดบิวทิริกและ กรดอะซิติกตามลำดับ โดยพบว่า การใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 40 กรัมต่อลิตร มีการผลิตตัวทำละลายเพียง 5.92 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าการใช้กลูโคส ถึง 2 เท่า จากการศึกษาผลของความเข้มข้น พบว่า ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตตัวทำละลาย โดยการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร เชื้อจะไม่สามารถใช้กลีเซอรอลได้หมด ยิ่งไปกว่านั้นการใช้กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสูงๆ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการใช้กลีเซอรอลลดลงอีกด้วย ทั้งนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่ 60 กรัมต่อลิตร หรือมากกว่า ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดน้อยลง

Khanna และคณะ (2013) ศึกษาการใช้กลีเซอรอลหยาบจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลผลิตบิวทานอล ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยใช้ *Clostridium pasteurianum* ตรีงรูปใน Amberlite พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลหยาบ ที่ 25 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลได้ของบิวทานอลสูงสุด และกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการผลิตบิวทานอล ความเข้มข้นกลีเซอรอล 5 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของเอทานอลสูงสุด และความเข้มข้นกลีเซอรอลที่ 10 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของ 1,3 -โพรเพนไดออลสูงสุด การตรึงเซลล์ยังทำให้เซลล์มีความทนต่อความเข้มข้นกลีเซอรอลที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ดินจากแหล่งเพาะปลูกพืชทางการเกษตร ได้แก่ กกล้วย มะม่วง เก็บตัวอย่างในจังหวัดสมุทรปราการ บริเวณถนนเลียบบคลองส่งน้ำสุวรรณภูมิ ตำบลบางปลา อำเภอบางพลี พิกัดละติจูด 13.5709176 และลองจิจูด 100.7588128 ดินจากแหล่งเพาะปลูกถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย เก็บตัวอย่างในจังหวัดจันทบุรี บริเวณตำบลคลองใหญ่ อำเภอโป่งน้ำร้อน พิกัดละติจูด 12.9516745 และลองจิจูด 102.4248387

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM, Difco™) ใช้เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดิน และใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium diolis* เพื่อให้มีการเจริญเติบโต (ภาคผนวก ก)

อาหาร Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB, Merck) ใช้เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างดินเพื่อให้มีการเจริญเติบโต (ภาคผนวก ก)

อาหาร T6 ซึ่งดัดแปลงจากอาหาร TYA ตามรายงานของ Ogata และคณะ (1973) ใช้เพื่อทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และ *Clostridium diolis* (ภาคผนวก ก)

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Chemical reagent	Company
Paraffin oil	Fisher Chemical, UK
กลีเซอรอล (Glycerol)	Merck, Germany
Citric acid	Merck, Germany
Sulfuric acid	QReC, New Zealand
Acetone	Baker SOLUSORB, USA
Butanol	Sigma-aldrich, USA
Ethanol	EMSURE, Germany

เอกสาร Methylene blue ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการสี Unilab, Australia ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chemical reagent	Company
Gram's iodine	Merck, Germany
Safanin O	Merck, Germany
Malachite green	DC find Chemical, London

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

Equipment	Company
แอนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar)	Merck, Germany
แผ่นดัดออกซิเจน (anaerobic cult [®])	Merck, Germany
เครื่องผสมสาร (Vortex)	รุ่น G560E, Scientific Industries, U.S.A
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	รุ่น UN110, Memmert, Germany
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet)	รุ่น BIO-II-Advance 4, Telstar, Spain
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)	รุ่น S220, Mettler Toledo, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	รุ่น Z 383.K, Hermle, Germany
หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave)	รุ่น HVE-50, Hirayama, Japan
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	รุ่น CH30RF200, Olympus, Japan
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง	TE214S, Sartorius, Germany
ออโต้ปิเปตต์ (Autopipettes)	Biohit, Finland
เครื่อง HPLC	Shimadzu, Japan
ตัวกรองสารขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (Syringe Filter)	Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Germany
ชุดกรองสูญญากาศ	Whatman, England
กระดาษกรองสาร Cellulose Acetate ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร	Sartorius stedim Biotech, Germany

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งเพาะปลูกพืชทางการเกษตร 6 ชนิด ได้แก่ กล้าย มะม่วง ถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย โดยชุดหลุมตัวอย่างละ 5 หลุม ให้ได้ระดับความลึกอย่างน้อย 0.5 เมตร แต่ละหลุมห่างกันอย่างน้อย 10 เมตร เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงซิปล็อคโดยใส่ให้เต็มถุง และปิดถุงให้สนิท เพื่อป้องกันอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

ทำการคัดแยกเชื้อโดยการนำตัวอย่างดินประมาณ 1 กรัม ใส่ลงหลอดทดลองที่มีน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางต่อจนได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อด้วยวิธีการ pour plate โดยใช้อาหารแข็ง RCM และ NA นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการคัดแยกเชื้อในแต่ละเพลทที่เป็นโคโลนีเดียว โดยคัดแยกเชื้อจากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี พื้นผิว และลักษณะขอบโคโลนี เป็นต้น โดยเชื้อเข้ามาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว RCM และ NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิดทับด้วย paraffin oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยถ่ายเชื้อจำนวน 2 ซ้ำ เพื่อนำไปใช้ในการคัดแยกเชื้อและเก็บเป็น stock เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการคัดแยก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้อากาศไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะของเชื้อด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram's stain) และย้อมเอ็นโดสปอร์ (endospore stain) ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ ทำการคัดเลือกเชื้อที่ย้อมติดสี แกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) และสร้างสปอร์ โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้ ถ่ายลงในเพลทอาหารแข็ง RCM และ NA ด้วยวิธีการ streak plate นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดียว จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล และอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส เพื่อทดสอบการผลิต ABE

3.2.3 การทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

ทำการถ่ายเชื้อที่คัดแยกได้ลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิดทับด้วย paraffin oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 3 ซ้ำ และถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อที่คัดแยกได้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล และ T6 ที่เติมกลูโคส มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณ ABE ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC)

3.2.4 การศึกษาลักษณะฟิโนไทป์ของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

นำเชื้อที่ได้จากการคัดแยกมาศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ตามคุณสมบัติที่ระบุไว้ในไว้ใน Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Whitman และ Parte, 2009) โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.1 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี Phenol red เป็น pH indicator (ภาคผนวก ก) และมีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ อะราบินอส (arabinose) ไชโลส (xylose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) และกลีเซอรอล (glycerol) ใส่หลอดดักก๊าซ (Durham tube) ลงในหลอดอาหารเพื่อทดสอบการผลิตก๊าซ ทำการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และปิดทับด้วย paraffin oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำมาอ่านผล

ผลบวก (+) คืออาหารที่ใช้ทดสอบเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง หรือสีชมพู (เชื้อสามารถย่อยแหล่งคาร์บอนในหลอดได้) และถ้ามีช่องว่างในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าการหมักนั้นมีก๊าซเกิดขึ้น (g) ถ้าไม่มีช่องว่างในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าการหมักนั้นไม่มีก๊าซเกิดขึ้น (ng)

ผลลบ (-) คืออาหารที่ใช้ทดสอบไม่เปลี่ยนสี (เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลในหลอดทดสอบนั้น)

3.2.4.2 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

ทำการถ่ายเชื้อที่จะทดสอบโดยทำการ streak ลงบนอาหารแข็งที่มี starch soluble 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน วิเคราะห์ผลโดยการหยดสารละลาย iodine ลงบนผิวหน้าอาหาร (Holdeman, 1977)

ผลบวก (+) คือ สารละลาย iodine ไม่เปลี่ยนสี (เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ amylase)

ผลลบ (-) คือเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase)

3.2.4.3 การทำงานของเอนไซม์ Catalase

ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ Catalase โดยเชื้อที่จะทดสอบจากอาหารแข็ง RCM มา smear ลงบนสไลด์ หยดสารละลาย H_2O_2 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น (Cappuccino และ Sherman, 2001)

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นฟองก๊าซ (เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้)

ผลลบ (-) คือไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น (เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นต้นการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.4 การเคลื่อนที่

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อและเชื้อที่ต้องการทดสอบมาแทง (stab) ลงในวุ้นหลอดอาหารแข็ง ซึ่งมี Agar เป็นองค์ประกอบ 5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ในแนวตั้งและยกเข็มเขี่ยเชื้อออกจากอาหารในแนวเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นสังเกตผล (Holdeman, 1977)

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นเชื้อเป็นแนวขุ่นออกจากบริเวณรอยที่ stab (เชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่)

ผลลบ (-) คือสังเกตเห็นเชื้อเป็นแนวขุ่นตามรอยที่ stab (เชื้อไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่)

3.2.4.5 การย่อยเจลาติน (gelatin)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อและเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วแทง (stab) ลงในวุ้นหลอดอาหารเจลาติน (ภาคผนวก ก) ในแนวตั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นสังเกตการย่อยเจลาตินในอาหาร โดยนำไปแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 30 นาที และนำออกมาสังเกตผล (Smith และ Goodner, 1958)

ผลบวก (+) คืออาหารจะเหลว (เกิดการย่อยเจลาติน)

ผลลบ (-) คืออาหารจะยังคงแข็งเหมือนเดิม (ไม่เกิดการย่อยเจลาติน)

3.3 การวิเคราะห์ผลการวิจัย

3.3.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

ส่วนสีที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ ABE ทั้งหมดโดยใช้เครื่อง HPLC โดยนำส่วนใสมารองด้วยตัวกรองสารขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาผสมกับกรดซिटริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อกรดซिटริก เท่ากับ 1 ต่อ 1 และใส่ขวด (vial) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร และใช้อุณหภูมิ (column oven) ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้กรดซिटริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที run time เป็นเวลา 25 นาที วิเคราะห์ผลด้วย Refractive index detector โดยวัดการหักเหแสงของสาร จากนั้นวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ ABE โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟที่มี Retention time เดียวกันมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้ทำการวิเคราะห์ไว้ก่อนหน้าแล้ว ดังภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 วิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์การผลิต ABE ของเชื้อที่คัดแยกได้และเปรียบเทียบการผลิต ABE ที่ได้ ด้วยการคำนวณทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ด้วยการทดสอบแบบ Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากกลีเซอรอล

คัดแยกเชื้อจากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร ได้แก่ กล้วย มะม่วง กล้วยอย่างใน จังหวัดสมุทรปราการ ถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย กล้วยอย่างในจังหวัดจันทบุรี ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) และ Nutrient agar (NA) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 271 ไอโซเลท จากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี ลักษณะพื้นผิว และลักษณะขอบโคโลนี เป็นต้น จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCM และ Nutrient broth (NB) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า จากเชื้อทั้งหมด 271 ไอโซเลท มีเพียง 68 ไอโซเลทจากอาหาร RCM และ 65 ไอโซเลทจากอาหาร NA ที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) และสร้างสปอร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้ ถ้ายกลงในเพลทอาหารแข็ง RCM และ NA ด้วยวิธีการ streak plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ก่อนนำไปถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเหลว T6 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) ต่อไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร โดยใช้อาหาร RCM และ NA บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตัวอย่างดินเพาะปลูกพืช	จำนวนตัวอย่าง	ไอโซเลททั้งหมด	ไอโซเลทที่คัดแยกได้เบื้องต้น*	
			RCM	NA
มะม่วง	5	34	10	10
กล้วย	5	39	12	13
ลำไย	5	40	10	12
ยาง	5	49	14	8
ถั่วพู	5	59	10	12
มันสำปะหลัง	5	50	12	10
จำนวนทั้งหมด	30	271	68	65

*หมายเหตุ: ทำการคัดแยกเบื้องต้นจากการสังเกตลักษณะเซลล์รูปท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก และการสร้างสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล 30 กรัมต่อลิตร และอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อที่คัดแยกได้ จากนั้นนำไปทดสอบการผลิต ABE ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลมีทั้งหมด 9 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกมันสำปะหลัง ถั่วพู และยางพารา โดยแหล่งดินมีลักษณะเป็นดินร่วนบนภูเขา อัดรวมกันแน่น และพืชทั้ง 3 ชนิดปลูกอยู่บริเวณแหล่งดินที่มีลักษณะเดียวกัน ทำให้สามารถพบเชื้อแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนจากแหล่งดินดังกล่าว เนื่องจากอากาศไม่สามารถแทรกผ่านไปได้ และอีก 124 ไอโซเลทไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณการผลิต ABE ของเชื้อทั้งในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล และอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส พบว่า ABE ที่ผลิตได้จากอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลมีปริมาณมากกว่าที่ผลิตได้จากอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคส ซึ่งบิวทานอลที่ผลิตได้จากอาหารเหลว T6 ที่เติมกลูโคสของทุกไอโซเลท มีปริมาณน้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า ไอโซเลท C22 และ C13 สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด คือ 2.50 กรัมต่อลิตร และ 2.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท C22 สามารถผลิตอะซิโตน 0.49 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 4.51 กรัมต่อลิตร และไอโซเลท C13 สามารถผลิตอะซิโตน 0.97 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 3.72 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือไอโซเลท B21 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 1.76 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตอะซิโตน 0.42 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 4.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 4.2

จากการศึกษาของ Biebl (2001) พบว่า *Clostridium pasteurianum* สามารถผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลได้ โดยรายงานว่าการผลิตบิวทานอลสูงถึง 17 กรัมต่อลิตร สำหรับ *Clostridium pasteurianum* DSM525 ในกระบวนการหมักแบบ batch Jae และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 จากของเสียที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 6.2-7.2 กรัมต่อลิตร Panitz และคณะ (2014) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium tetanomorphum* สายพันธุ์ GT6 จากตะกอนในแหล่งน้ำบริเวณเมืองมิวนิค ประเทศเยอรมนี โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM ที่มีกลีเซอรอล 3% พบว่ามีเพียงบิวทานอลและเอทานอลเท่านั้นที่ถูกผลิตหลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารเหลือ T6 ที่เติมกลีเซอรอล 3 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอาหารเหลือ T6 ที่เติมกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ไอโซเลท	แหล่งตัวอย่างดิน	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)			ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 ที่เติมกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		
		อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล
R11	ยางพารา	1.64 ^{bc} ± 1.09	0.37 ^e ± 0.29	1.24 ^e ± 0.33	1.99	0.22	2.54
R16	ยางพารา	2.58 ^a ± 0.09	0.44 ^e ± 0.10	1.13 ^e ± 0.15	1.36	0.05	1.62
C11	มันสำปะหลัง	1.83 ^b ± 0.15	0.74 ^d ± 0.12	2.13 ^d ± 0.17	1.56	0.20	6.02
B16	ถั่วพู	0.44 ^d ± 0.41	1.40 ^c ± 0.12	3.91 ^b ± 0.76	1.00	0.19	2.82
C21	มันสำปะหลัง	1.19 ^{bcd} ± 0.12	1.43 ^c ± 0.07	3.10 ^c ± 0.14	2.52	0.14	0.74
C20	มันสำปะหลัง	1.40 ^{bc} ± 0.31	1.44 ^c ± 0.12	2.91 ^c ± 0.24	3.03	0.25	0.85
B21	ถั่วพู	0.42 ^d ± 0.04	1.76 ^b ± 0.20	4.63 ^a ± 0.26	1.32	0.22	1.03
C13	มันสำปะหลัง	0.97 ^{cd} ± 0.23	2.38 ^a ± 0.20	3.72 ^b ± 0.26	1.38	0.13	3.66
C22	มันสำปะหลัง	0.49 ^d ± 0.05	2.50 ^a ± 0.19	4.51 ^a ± 0.09	2.01	0.19	2.98
และ 124 ไอโซเลท		ไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้					

หมายเหตุ : a b c d และ e ในแต่ละสดมภ์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

และ ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ยกเว้นอาหาร T6 ที่เติมกลูโคส เนื่องจากทำการทดลองหนึ่งซ้ำ

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อที่คัดแยกได้

4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

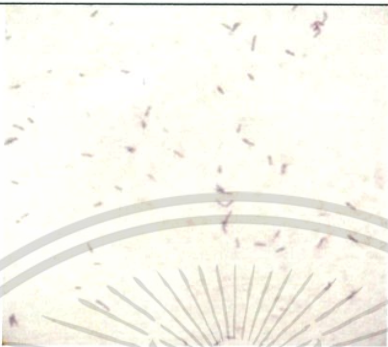
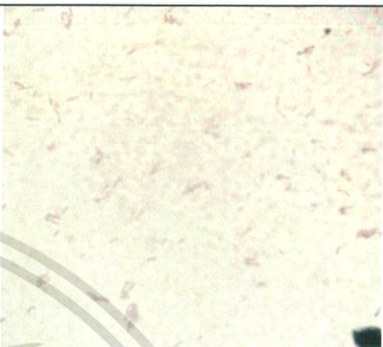




เชื้อ 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูง ได้แก่ ไอโซเลท C22 C13 และ B21 ดังข้อมูลในตารางที่ 4.2 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยสังเกตลักษณะโคโลนีบนเพลทอาหารแข็ง RCM และ NA พบว่า โคโลนีมีรูปร่างค่อนข้างกลม ขอบมีลักษณะขรุขระ มีสีขาวทึบแสง ผิวเรียบเนียนและมันวาว ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 4.1 เมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า มีลักษณะเป็นรูปท่อน ย้อมติดแกรมบวก และเมื่อนำมาย้อมสปอร์เห็นได้ว่าลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อยู่บริเวณปลายเซลล์ทำให้เซลล์บริเวณนั้นบวมเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Clostridium* sp. ตามการรายงานใน Bergey's manual of Systematic 3rd (2009) ซึ่งได้ระบุลักษณะเซลล์ไว้ว่า เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งและโค้งมนบริเวณปลายเซลล์ ย้อมติดสีแกรมบวก แต่หากเซลล์มีอายุมากจะย้อมติดสีแกรมลบ สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่อยู่ด้านปลายเซลล์ (subterminal)



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของไอโซเลท C22 ที่ปรากฏในอาหารแข็ง RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท C22 C13 และ B21 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ไอโซเลท	การย้อมแกรม (กำลังขยาย 1000 เท่า)	การย้อมสปอร์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)
C22		
C13		
B21		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

การทดสอบลักษณะฟีโนไทป์ ได้แก่ การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) การสร้างเอนไซม์ Catalase การย่อยเจลาติน การผลิตเอนไซม์อะไมเลส และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ของเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถนำมาพิจารณาลักษณะและความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้น โดยนำมาเปรียบเทียบกับ *C. diolis* รวมถึงลักษณะของ *C. diolis* และ *C. pasteurianum* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic จากตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท C22 C13 และ B21 มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้เหมือนกันกับ *C. diolis* รวมถึง *C. diolis* และ *C. pasteurianum* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic แต่พบว่าไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase และไม่มีความสามารถในการย่อยเจลาติน เมื่อทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อไอโซเลท C13 และ C22 สามารถใช้อะราบินอส (Arabinose) ไซโลส (Xylose) กลูโคส (Glucose) แมนโนส (Mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) และกลีเซอรอล (glycerol) ได้ และไอโซเลท B21 สามารถใช้กลูโคส แมนโนส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส และกลีเซอรอลได้ แต่ไม่สามารถใช้อะราบินอส และไซโลสได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกับ *C. diolis* ที่ใช้ในการทดสอบจริง รวมถึง *C. diolis* และ *C. pasteurianum* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic พบว่า *C. diolis* สามารถใช้ได้เพียงอะราบินอส ไซโลส กลูโคส และแมนโนส เท่านั้น ซึ่งผลการทดสอบที่ได้ไม่เหมือนกันกับ *C. diolis* และ *C. pasteurianum* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic คือ *C. diolis* สามารถใช้อะราบินอส ไซโลส แมนโนส เซลโลไบโอส และแลคโตสได้ และ *C. pasteurianum* สามารถใช้อะราบินอส ไซโลส แมนโนส แลคโตส และมอลโตสได้ และในการทดสอบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) พบว่าไอโซเลท C22 C13 และ B21 ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้เหมือนกันกับ *C. diolis* รวมถึง *C. diolis* และ *C. pasteurianum* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ลักษณะฟีโนไทป์ของไอโซเลท B21 C13 C22 และ *Clostridium diolis* จากการทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับลักษณะฟีโนไทป์ของ *C. pasteurianum* และ *C. diolis* จาก Bergey's manual of Systematic

characteristic	B21	C13	C22	<i>C. diolis</i>	<i>C. diolis</i> (Bergey's)	<i>C. pasteurianum</i> (Bergey's)
Motility	+	+	+	+	+	+
Catalase test	-	-	-	-	NT	NT
Gelatin	-	-	-	-	NT	NT
Carbon source						
Arabinose	-	+	+	+	w	w
Xylose	-	+	+	+	+	w
Glucose	+/ng	+	+	+	NT	NT
Mannose	+/ng	+	+	+	w	+
Cellobiose	+/ng	+	+	-	+	-
Lactose	+	+/ng	+/ng	-	w	w
Maltose	+	+	+	-	NT	+
Glycerol	+/ng	+	+	-	NT	NT
Starch	-	-	-	-	-	w

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + คือ ผลบวก , เครื่องหมาย - คือ ผลลบ , ng คือ ไม่ผลิตแก๊ส , NT คือ ไม่ได้ทำการทดลอง , w คือ weak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) ได้จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร ได้แก่ กล้าย มะม่วง ถั่วพู ยางพารา มันสำปะหลัง และลำไย พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 271 ไอโซเลท โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี พื้นผิว และลักษณะขอบโคโลนี เป็นต้น แต่มีเพียง 68 ไอโซเลทจากอาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) และ 65 ไอโซเลทจากอาหาร Nutrient agar (NA) ที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) และสร้างสปอร์ เมื่อถ่ายเชื้อทั้งหมด 133 ไอโซเลท ลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล จากนั้นนำไปทดสอบการผลิต ABE ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลมีทั้งหมด 9 ไอโซเลท โดยมีไอโซเลท C22 และ C13 ซึ่งคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกมันสำปะหลัง สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด คือ 2.50 กรัมต่อลิตร และ 2.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือไอโซเลท B21 ซึ่งคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกยางพารา สามารถผลิตบิวทานอลได้ 1.76 กรัมต่อลิตร โดยไอโซเลท C22 C13 และ B21 สามารถผลิตอะซิโตนได้ 0.49 กรัมต่อลิตร 0.97 กรัมต่อลิตร และ 0.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และผลิตเอทานอลได้ 4.51 กรัมต่อลิตร 3.72 กรัมต่อลิตร และ 4.63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) พบว่า โคโลนีมีรูปร่างค่อนข้างกลม ขอบมีลักษณะขรุขระ มีสีขาวทึบแสง ผิวเรียบเนียนและมันวาว เมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า มีลักษณะเป็นรูปท่อน ย้อมติดแกรมบวก และเมื่อนำมาย้อมสปอร์เห็นได้ว่าลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อยู่บริเวณปลายเซลล์ทำให้เซลล์บริเวณนั้นบวมเล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Clostridium* sp.

เมื่อศึกษาลักษณะฟิโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) พบว่า เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มีความสามารถในการเคลื่อนที่ แต่ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase และ ไม่มีความสามารถในการย่อยเจลาติน ในการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนนั้น ไอโซเลท C22 และ C13 สามารถใช้อะราบินอส (Arabinose) ไซโลส (Xylose) กลูโคส (Glucose) แมนโนส (Mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) และกลีเซอรอล (glycerol) ได้ และไอโซเลท B21 สามารถใช้กลูโคส แมนโนส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส และกลีเซอรอลได้ แต่ไม่สามารถใช้อะราบินอสและไซโลสได้ และในการทดสอบการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์
 ไม่ว่ากรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการใช้เอนไซม์อะไมเลส

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถจำแนกหรือระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จึงควรทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่คัดแยกได้ด้วยวิธี 16S rRNA และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อชนิดใด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- วรารัตน์ เลิศสนเมธากุล. 2553. กระบวนการผลิตกลีเซอรอลคาร์บอนเนตจากกลีเซอรอลดิบที่ได้จาก กระบวนการผลิตไบโอดีเซล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อภิชัย สาวีสวัสดิ์. 2553. การผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี.
- อังคณา สุจริต, ชุตินฉัตร สกริพัฒน์กุล, จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, วรกันต์ บุรพาธนะ และ เหมือน เตือน พิศาลพงศ์. 2553. การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมใน กระบวนการหมักแบบกะ. วิศวกรรมสาร มข. 4, 339-347.
- Ahn, J.H., Sang, B.I. and Um, Y. 2011. Butanol production from thin stillage using *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource Technology*. 102: 4934-4937.
- Andrade, J.C. and Vasconcelos, I. 2003. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilization. *Biotechnology Letters*. 25: 121-125.
- Benito, G.G. 1994. Continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor with immobilized cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 49: 209-212.
- Biebl, H., Marten, S., Hippe, H. and Deckwer, W.D. 1992. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36: 592-597.
- Biebl, H. 2001. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27: 18-26.
- Biebl, H. and Sproer, C. 2002. Taxonomy of the Glycerol fermenting Clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 25: 491-497.
- Bochman, M. 1999. *Advanced Inorganic Chemistry*. USA : John Wiley & Sons, Inc.
- Jones, D.T. and Woods, D.R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*. 50: 484-524.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Campos, E., Qureshi, N. and Blaschek, H. 2002. Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98(100): 553-561.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N. 2001. Microbiology a laboratory manual, 6th. Benjamin Cummings. San Francisco.
- Da Silva, G.P., Mack, M. and Contiero, J. 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnology Advances. 27: 30-39.
- Daniel, R., Boenigk, R. and Gottschalk, G. 1995. Purification of the 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing, and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 177: 2151-2156.
- Davis, S. E. and Morton, S.A. 2008. Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water. Separation Science and Technology. 43: 2460-2472.
- Durre, P. 2008. Fermentative butanol production. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125: 353-362.
- Forage, R.G. and Lin, E.C. 1982. DNA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. Journal of Bacteriology. 151: 591-599.
- Forsberg, C.W. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. Applied and Environmental Microbiology. 53: 639-643.
- Fukuda, H., Akiniko, K. and Hideo, N. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92(5): 405-416
- Gallardo, R., Alves, M. and Rodrigues, L.R. 2014. Modulation of crude glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 towards the production of butanol. Biomass and Bioenergy. 71: 134-143.
- Gallardo, R., Alves, M. and Rodrigues, L.R. 2017. Influence of nutritional and operational parameters on the production of butanol or 1,3-propanediol from glycerol by a mutant *Clostridium pasteurianum*. New Biotechnology 34: 59-67.
- Hansch, C., Leo, A. and Hoekman, D. 1995. Exploring QSAR hydrophobic, electronic and steric constants. American Chemical Society, Washington, DC.

- Hansen, A.C. Zhang, Q. and Lyne, P.W.L. 2005. Ethanol diesel fuel blends – A review. *Bioresource Technology*. 96: 277-285.
- Huber, G.W. Iborra, S. and Corma, A. 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews*. 106: 4044-4098.
- Khanna, S., Goyal, A. and Moholkar, V.S. 2013. Production of n-butanol from biodiesel derived crude glycerol using *Clostridium pasteurianum* immobilized on Amberlite. *Fuel*. 112: 557–561.
- Krasnan, V., Plz, M., Marr, A.C., Markosova, K., Rosenberg, M., and Rebros, M. 2018. Intensified crude glycerol conversion to butanol by immobilized *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical Engineering Journal*. 134: 114–119.
- Kristin, B. 2007. Butanol – an energy alternative? *Ethanol Today*. : 36-39.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Neilsem, L.K., Kim, J., and Lung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. 101: 209-228.
- Liu, Y., Liu, D., Su, Q. and Xie D. 2002. Glycerol production by *Candida krusei* employing NaCl as an osmoregulator in batch and continuous fermentations. *Biotechnology Letters*. 24: 1137-1140
- Malaviya, A., Jang, Y.S. and Lee, S. 2012. Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of *Clostridium pasteurianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(4): 1485–1494.
- Monot, F., Martin, J., Petitdemange, H. and Gay, R. 1982. Acetone and butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 14: 1318-1324.
- Myers, R.L. 2007. The 100 Most Important Chemical compounds. 1st ed. United States of America : Greenwood Publishing Group.
- Niven, R.K. 2005. Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 9: 535-555.
- Ogata, S., and Hongo, M. 1973. Bacterial lysis of *Clostridium* species. I. Lysis of *Clostridium* species by univalent cation. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 19: 251-261.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Panitz, J.C., Zverlov, V.V., Pham, V.T.T., Sturzl, S., Schieder, D. and Schwarz, W.H. 2014. Isolation of a solventogenic *Clostridium* sp. strain: Fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the bcs operon region and its potential regulatory elements. *Systematic and Applied Microbiology*. 37: 1–9.
- Sarchami, T., Johnson, E. and Rehmann, L. 2016. Optimization of fermentation condition favoring butanol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525. *Bioresource Technology*. 208: 73–80.
- Wackett, L.P. 2008. Biomass to fuels via microbial transformations. *Current Opinion in Chemical Biology*. 12: 187-193
- Xin, F., Chen, T., Jiang, Y., Lu, J., Dong, W., Zhang, W., Ma, J., Zhang, M. and Jiang, M. 2017. Enhanced biobutanol production with high yield from crude glycerol by acetone uncoupled *Clostridium* sp. strain CT7. *Bioresource Technology*. 244: 575–581.
- Zhuge, J., Fang, H.Y., Wang, Z.X., Chen, D.Z., Jin, H.R. and Gu, H.L. 2001. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 686-692
- [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.gcsescience.com/o38.htm> (วันที่สืบค้น 2 พฤษภาคม 2561)
- [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://nurlaelahjamil.wordpress.com/2013/12/31/bakteri-penambat-nitrogen-n2-clostridium-pasteurianum> (วันที่สืบค้น 2 พฤษภาคม 2561)
- [Online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1001/triglyceride> (วันที่สืบค้น 11 พฤษภาคม 2561)
- [Online]. เข้าถึงได้จาก : <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol> (วันที่สืบค้น 11 พฤษภาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridial (RCM, Difco™) มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ(Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตเน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
น้ำแป้ง (Soluble starch)	1.0	กรัมต่อลิตร
เด็กซ์โตรอส (Dextrose)	5.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	3.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น(Agar)	0.5	กรัมต่อลิตร

ซังผงอาหาร RCM ปริมาณ 38 กรัม มาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร T6 ที่เติมกลูโคส (Glucose) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยดัดแปลงจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata และคณะ (1973) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตเน (Tryptone)	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัมต่อลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอะซิเตต	3.0	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.5	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	30	กรัมต่อลิตร

ซังส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล (Glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยยัดแปลงจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata และคณะ (1973) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3	กรัมต่อลิตร
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอะซิเตต	3.0	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.5	กรัมต่อลิตร
กลีเซอรอล	23.8	มิลลิลิตรต่อลิตร*

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : * คำนวณจากสูตร ความหนาแน่น (d) = มวล (m)/ปริมาตร (v)

$$v = \frac{m}{d}$$

$$= \frac{30 \text{ g}}{1.26 \text{ g/ml}}$$

$$= 23.8 \text{ มิลลิลิตร}$$

อาหารทดสอบความสามารถใช้แหล่งคาร์บอน ดัดแปลงสูตรอาหารจาก Atlas (2010) มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
Phenol red	0.018	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลชนิดต่างๆ	10.0	กรัมต่อลิตร

ซึ่งองค์ประกอบของอาหาร รวมถึงน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ อะราบินอส ไซโลส กลูโคส แมนโนส เซลโลไบโอส แลคโตส มอลโตส หรือกลีเซอรอล นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

จนมีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.4 ± 0.2 ปิดเตาให้หลอดทดลอง หลอดละ 1 หลอด ปิดฝาทันที ไม่อย่างนั้น น้ำจะระเหยออก ทำให้ปริมาตรลดลง และค่า pH จะเปลี่ยนแปลงไป

10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่หลอดดักก๊าซ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารสำหรับการทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ให้ชั่งองค์ประกอบของอาหาร ยกเว้น Phenol red เติมผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร และเติม starch soluble แทนน้ำตาลชนิดต่างๆ นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.4 ± 0.2 ปิดเตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นใส่หลอดดักก๊าซ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (MacFaddin, 1985) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	5.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งองค์ประกอบของอาหาร นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2 ปิดเตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารทดสอบการย่อยเจลาติน (Zimbro และคณะ, 2009) มีองค์ประกอบ ดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัมต่อลิตร
เจลาติน (Gelatin)	120.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งองค์ประกอบของอาหาร นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 ปิดเตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

บิวทานอลความเข้มข้น 99.4 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล (MW) 74.12 กรัมต่อโมล และความหนาแน่น (d) 0.81 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นบิวทานอล (C_{Butanol}) จากสูตร

$$C_{\text{Butanol}} = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$

$$= \frac{10 \times 0.81 \text{ g/ml} \times 99.4 \%}{74.12 \text{ g/mol}}$$

$$= 10.86 \text{ โมลต่อลิตร}$$

การเตรียมสารละลายบิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$10.86 \text{ mol/L} \times V_1 = 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 9.2 \text{ มิลลิลิตร}$$

การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

ยกตัวอย่างการเตรียมสารละลายบิวทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น สามารถเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลต่อลิตร ใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลต่อลิตร ใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

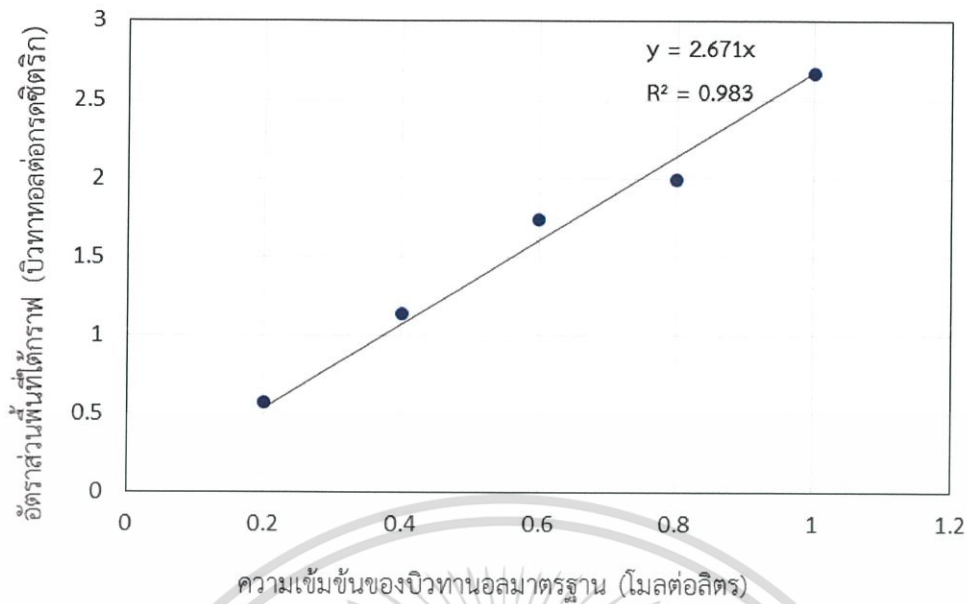
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบิวทานอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

ตารางที่ ข.1 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8 x 150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือ กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลาย บิวทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ บิวทานอล	พื้นที่ใต้กราฟ กรดซिटริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล ต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก
0.2	762157	1329989	0.573954
0.4	1468045	1292561	1.135422
0.6	2262578	1302688	1.736767
0.8	2666515	1350412	1.995861
1.0	3514503	1317238	2.668476

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟบิวทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

เอทานอล ความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 46.08 กรัมต่อโมล และความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นเอทานอล (C_{Ethanol}) จากสูตร

$$\begin{aligned}
 C_{\text{Ethanol}} &= \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} \\
 &= \frac{10 \times 0.789 \text{ g/ml} \times 99.5 \%}{46.08 \text{ g/mol}} \\
 &= 17.04 \text{ โมลต่อลิตร}
 \end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายเอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$17.04 \text{ mol/L} \times V_1 = 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 $V_1 = 5.87$ มิลลิลิตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

$$\text{คำนวณจากสูตร} \quad C_1V_1 = C_2V_2$$

ยกตัวอย่างการเตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น สามารถเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลต่อลิตร ใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลต่อลิตร ใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

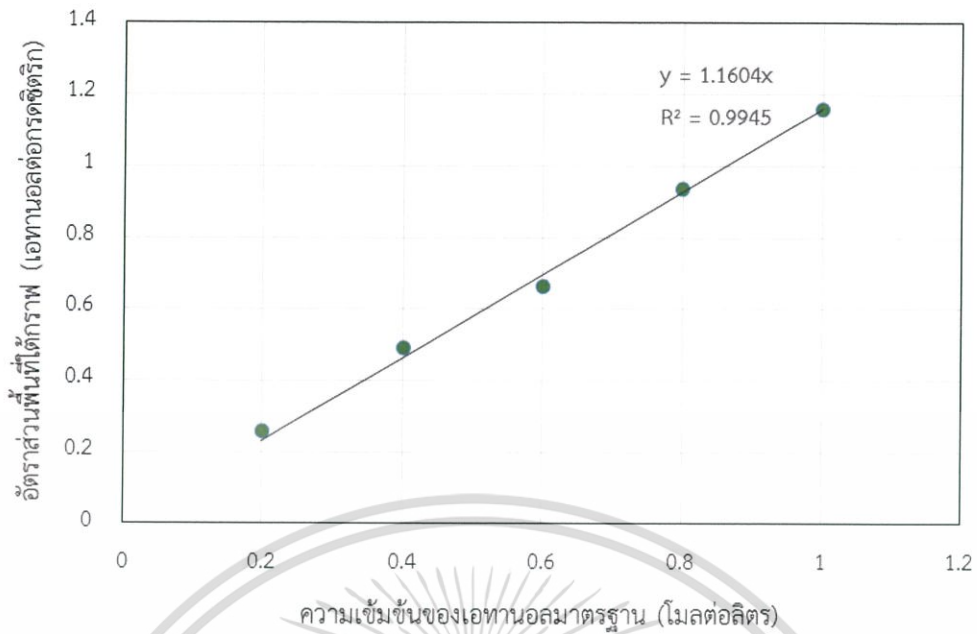
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

ตารางที่ ข.2 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8 x 150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล	พื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก
0.2	334904	1291172	0.259546
0.4	621793	1264427	0.492405
0.6	860953	1299755	0.662239
0.8	1194122	1276780	0.936045
1.0	1498482	1294100	1.157887

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก

การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

อะซิโตน ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 58.08 กรัมต่อโมล และความหนาแน่น 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นอะซิโตน (C_{Acetone}) จากสูตร

$$C_{\text{Acetone}} = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$

$$= \frac{10 \times 0.79 \text{ g/ml} \times 99.8 \%}{58.08 \text{ g/mol}}$$

$$= 13.57 \text{ โมลต่อลิตร}$$

การเตรียมสารละลายอะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$13.57 \text{ mol/L} \times V_1 = 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 $V_1 = 7.37 \text{ มิลลิลิตร}$
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

$$\text{คำนวณจากสูตร} \quad C_1V_1 = C_2V_2$$

ยกตัวอย่างการเตรียมสารละลายอะซิโตนที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น สามารถเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลต่อลิตร ใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลต่อลิตร ใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

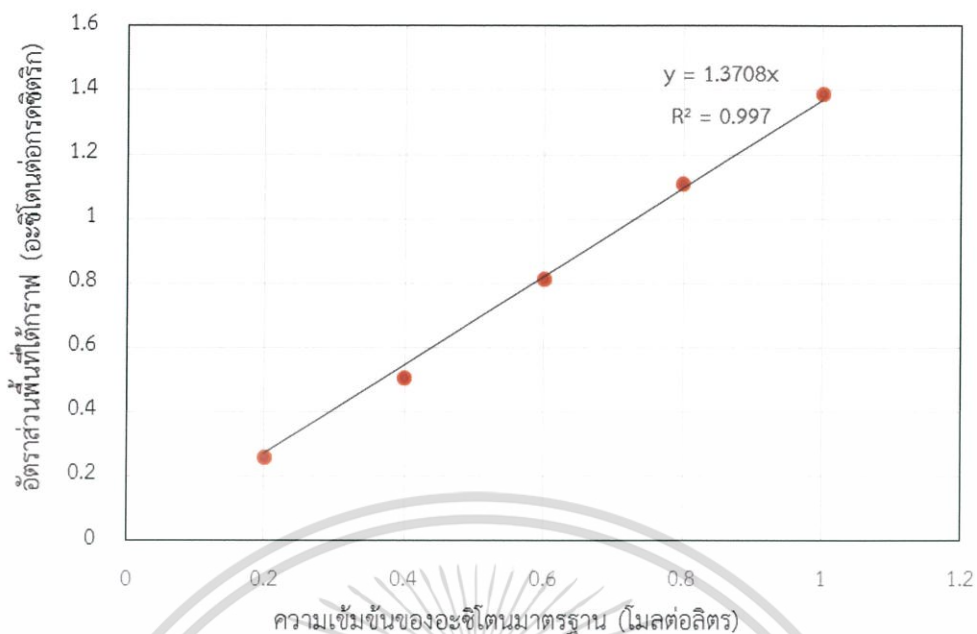
และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอล

มาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

ตารางที่ ข.3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Fermentation Monitor ขนาด 7.8×150 มิลลิเมตร ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรด ซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลาย อะซิโตนมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ อะซิโตน	พื้นที่ใต้กราฟ กรดซिटริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟอะซิโตน ต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก
0.2	338727	1317097	0.25752
0.4	674805	1336367	0.507328
0.6	1071499	1324480	0.811667
0.8	1441814	1300731	1.109198
1.0	1824248	1318517	1.386879

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตนซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟอะซิโตนต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก

การเตรียมสารละลาย Internal standard

การเตรียมสารละลายกรดซิตริก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซังกรดซิตริก 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองสาร Cellulose Acetate เพื่อนำไปผสมกับตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในอัตราส่วนของตัวอย่างต่อสารละลาย internal standard 1 : 1

การเตรียม Mobile phase

การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปิเปตกรดซัลฟิวริก 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองสาร Cellulose Acetate และนำไป sonicated เพื่อไล่แก๊สออกจากสารละลาย จากนั้นนำไปใช้เป็น Mobile phase ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก จากสูตร

$$\begin{aligned}
 C_{\text{sulfuric acid}} &= \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} \\
 &= \frac{10 \times 1.84 \text{ g/ml} \times 98 \%}{98.08 \text{ g/mol}} \\
 &= 18.38 \text{ โมลต่อลิตร}
 \end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายซัลฟิวริก 0.005 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$18.38 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.005 \text{ mol/L} \times 1000 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0.272 \text{ มิลลิลิตร}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ไอโซเลท	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
R11	3	1.63505	1.088131	.628233	-1.06802	4.33811	.379	2.303
R16	3	2.57709	.090611	.052314	2.35200	2.80218	2.481	2.661
B16	3	.43514	.410217	.236839	-.58390	1.45417	.180	.908
B21	3	.42030	.035634	.020573	.33178	.50882	.381	.450
C11	3	1.83257	.154306	.089089	1.44925	2.21588	1.713	2.007
C13	3	.96927	.227350	.131261	.40450	1.53404	.733	1.187
C20	3	1.39981	.310578	.179312	.62830	2.17133	1.162	1.751
C21	3	1.19188	.115465	.066664	.90505	1.47871	1.109	1.324
C22	3	.48968	.048175	.027814	.37000	.60935	.453	.544
Total	27	1.21675	.782520	.150596	.90720	1.52631	.180	2.661

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.822	8	1.603	9.310	.000
Within Groups	3.099	18	.172		
Total	15.921	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
B21	3	.42030			
B16	3	.43514			
C22	3	.48968			
C13	3	.96927	.96927		
C21	3	1.19188	1.19188	1.19188	
C20	3		1.39981	1.39981	
R11	3		1.63505	1.63505	
C11	3			1.83257	
R16	3				2.57709
Sig.		.053	.086	.098	1.000

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารT6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ไอโซเลท	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
R11	3	.36832	.288805	.166741	-.34911	1.08575	.038	.571
R16	3	.43739	.098417	.056821	.19291	.68187	.331	.525
B16	3	1.40132	.119448	.068964	1.10459	1.69805	1.321	1.539
B21	3	1.76255	.203625	.117563	1.25672	2.26838	1.643	1.998
C11	3	.74034	.115709	.066805	.45291	1.02778	.650	.871
C13	3	2.37651	.196049	.113189	1.88950	2.86352	2.185	2.576
C20	3	1.43762	.117094	.067604	1.14674	1.72850	1.323	1.557
C21	3	1.42795	.072830	.042048	1.24703	1.60887	1.365	1.507
C22	3	2.50158	.193088	.111479	2.02192	2.98124	2.286	2.659
Total	27	1.38373	.751594	.144644	1.08641	1.68105	.038	2.659

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.173	8	1.772	62.056	.000
Within Groups	.514	18	.029		
Total	14.687	26			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
R11	3	.36832				
R16	3	.43739				
C11	3	.74034				
B16	3			1.40132		
C21	3			1.42795		
C20	3			1.43762		
B21	3				1.76255	
C13	3					2.37651
C22	3					2.50158
Sig.		.623	1.000	.807	1.000	.377

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ไอโซเลท	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขต	ขอบเขตบน		
					ล่าง			
R11	3	1.23829	.333285	.192422	.41037	2.06622	.866	1.509
R16	3	1.13317	.152834	.088239	.75351	1.51283	1.001	1.301
B16	3	3.91128	.761381	.439584	2.01990	5.80265	3.133	4.654
B21	3	4.62610	.257890	.148893	3.98546	5.26673	4.346	4.854
C11	3	2.12850	.168105	.097055	1.71090	2.54610	1.948	2.280
C13	3	3.72224	.259437	.149786	3.07776	4.36671	3.423	3.878
C20	3	2.90664	.241338	.139336	2.30712	3.50616	2.628	3.057
C21	3	3.10117	.142900	.082504	2.74619	3.45616	2.967	3.251
C22	3	4.51078	.091502	.052829	4.28347	4.73808	4.417	4.600
Total	27	3.03091	1.283597	.247028	2.52313	3.53868	.866	4.854

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40.912	8	5.114	47.782	.000
Within Groups	1.926	18	.107		
Total	42.838	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
R16	3	1.13317				
R11	3	1.23829				
C11	3		2.12850			
C20	3			2.90664		
C21	3			3.10117		
C13	3				3.72224	
B16	3				3.91128	
C22	3					4.51078
B21	3					4.62610
Sig.		.699	1.000	.476	.488	.671



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

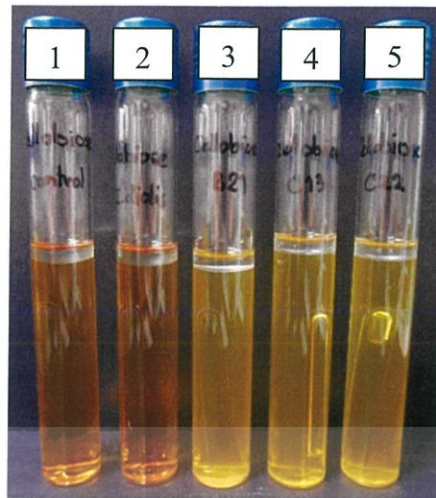
การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

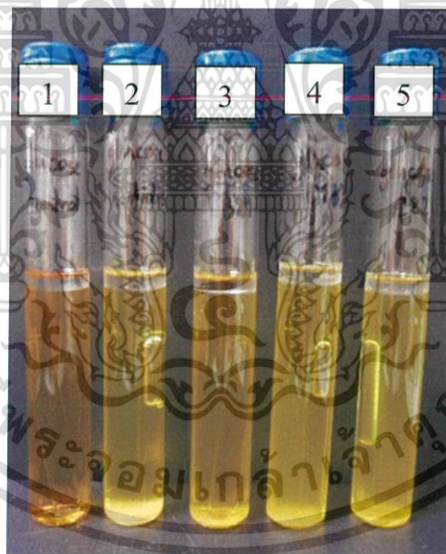


ภาพที่ ง.1 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Arabinose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

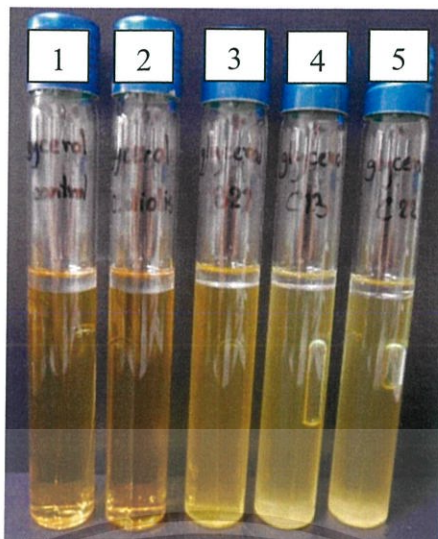


ภาพที่ ง.2 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Cellobilose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22



ภาพที่ ง.3 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Glucose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

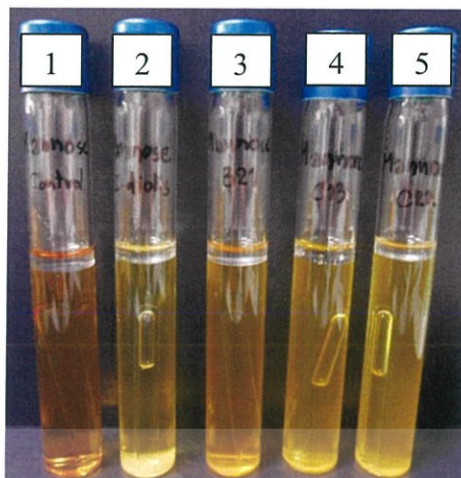


ภาพที่ ง.4 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22



ภาพที่ ง.5 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Lactose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

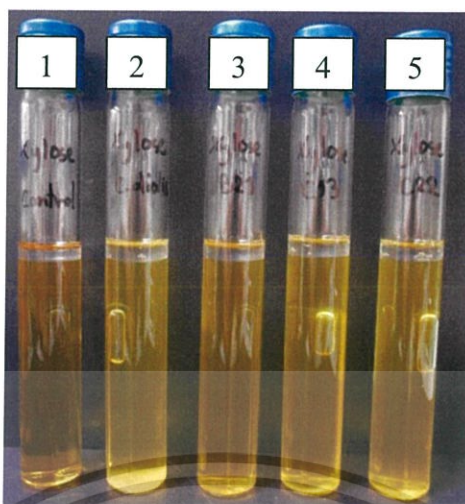


ภาพที่ ง.6 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Mannose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22



ภาพที่ ง.7 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Maltose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



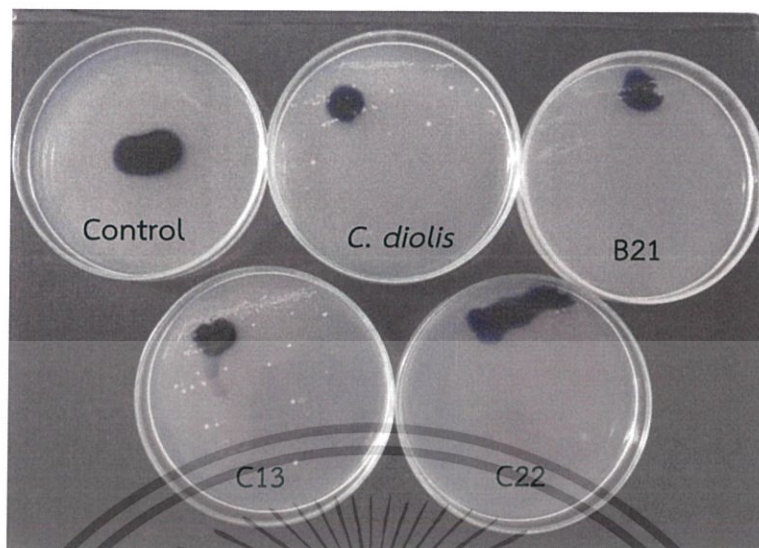
ภาพที่ ง.8 การเจริญเติบโตและผลิตแก๊สของเชื้อโดยใช้ Xylose เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

ผลบวก (+) คืออาหารที่ใช้ทดสอบเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง (เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในหลอดได้) และถ้ามีช่องว่างในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าการหมักนั้นมีการเกิดก๊าซ (+) ถ้าไม่มีช่องว่างในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าการหมักนั้นไม่มีก๊าซเกิดขึ้น (ng)

ผลลบ (-) คืออาหารที่ใช้ทดสอบเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือไม่เปลี่ยนสี (เชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลในหลอดทดสอบนั้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase)



ภาพที่ ๙.๙ การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อ ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ผลบวก (+) คือสารละลาย iodine ไม่เปลี่ยนสี (เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ amylase)

ผลลบ (-) คือเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน (เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ amylase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility)



ภาพที่ ง.10 การเคลื่อนที่ของเชื้อภายในหลอดอาหาร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นเชื้อเป็นแนวขุ่นออกจากบริเวณรอยที่ stab (เชื้อมีความสามารถในการเคลื่อนที่)

ผลลบ (-) คือสังเกตเห็นเชื้อเป็นแนวขุ่นตามรอยที่ stab (เชื้อไม่มีความสามารถในการเคลื่อนที่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin)



ภาพที่ ง.11 การทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาตินของเชื้อ หลังจากแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที เมื่อป้อนเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดย หลอดที่ 1 คือ control หลอดที่ 2 คือ *Clostridium diolis* หลอดที่ 3 คือ ไอโซเลท B21 หลอดที่ 4 คือ ไอโซเลท C13 หลอดที่ 5 คือ ไอโซเลท C22

ผลบวก (+) คืออาหารจะเหลว (เกิดการย่อยเจลาติน)

ผลลบ (-) คืออาหารจะยังคงแข็งเหมือนเดิม (ไม่เกิดการย่อยเจลาติน)

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ Catalase



ภาพที่ ง.12 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Catalase ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ซึ่งรอยขุ่นที่เห็นเป็นรอบขุ่นจากการ smear เชื้อ ไม่ใช่ลักษณะของฟองก๊าซ

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นฟองก๊าซ (เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้)

ผลลบ (-) คือไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น (เชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase ได้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยจุลชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้