

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลด้วยแบคทีเรียที่เรื้อยที่คัดแยกได้

Butanol production from glycerol by isolated bacteria



ชนิสรา ดีพุ่ม  
ชนนิกานต์ คนหาญ  
ณัฐพงษ์ ชราศรี

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ปีการศึกษา 2561

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BUTANOL PRODUCTION FROM GLYCEROL  
BY ISOLATED BACTERIA



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

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ACADEMIC YEAR 2018  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงการพิเศษ**

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้  
BUTANOL PRODUCTION FROM GLYCEROL BY ISOLATED  
OF BACTERIA

**ชื่อนักศึกษา**

นางสาวชนิสรา ดีพุ่ม รหัสนักศึกษา 58050730  
นางสาวชนิกานต์ คนหาญ รหัสนักศึกษา 58050732  
นายณัฐพงษ์ ชราศรี รหัสนักศึกษา 58050751

**ปริญญา**

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

**ภาควิชา**

ชีววิทยา

**คณะ**

วิทยาศาสตร์

**มหาวิทยาลัย**

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

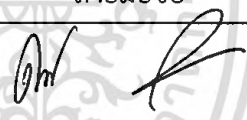
**ปีการศึกษา**

2561

**อาจารย์ที่ปรึกษา**

ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ประจำปี  
การศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้ง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลด้วยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ BUTANOL PRODUCTION FROM GLYCEROL BY ISOLATED OF BACTERIA	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชนิสรา ดีพุ่ม รหัสนักศึกษา 58050730 นางสาวชนนิกันต์ คนหาญ รหัสนักศึกษา 58050732 นายณัฐพงษ์ ชราศรี รหัสนักศึกษา 58050751	
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

### บทคัดย่อ

บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีแนวโน้มในการเป็นพลังงานทดแทนด้วยคุณสมบัติของเชื้อเพลิงคล้ายกับน้ำมันเบนซินและสามารถสังเคราะห์ได้จากการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของ *Clostridium* sp. จุลินทรีย์นี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น กลูโคส การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การนำกลีเซอรอลบริสุทธิ์และกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ทำการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* sp. จำนวน 9 สายพันธุ์ ที่สามารถใช้กลีเซอรอลบริสุทธิ์และผลิตอะซิโตนบิวทานอลและเอทานอลได้ ในการศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียได้รับการตรวจสอบความถูกต้องสำหรับการจำแนกชนิดโดยการย้อมแกรม, เอนโดสปอร์และการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากกลีเซอรอล ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเป็นแกรมบวก รูปร่างท่อนและมีการสร้างเอนโดสปอร์ นอกจากนี้เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยในการทำงาน จึงมีการเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจสอบหาภาวะการย่อยเม็ดเลือดแดง ผลปรากฏว่าไม่มีการแตกของเม็ดเลือดแดง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ไม่ก่อโรค จากนั้นจึงนำไปทดสอบศักยภาพในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 30 กรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ C13 ให้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุดคือ  $2.66 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 72 ดังนั้นจึงเลือก C13 เพื่อนำมาศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสม ซึ่งการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ใช้ความเข้มข้น 10-50 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุดคือ  $3.26 \pm 0.30$  กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมกลีเซอรอลดิบลงในอาหาร T6 ด้วยความเข้มข้น 1-5 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงสุดที่  $2.78 \pm 0.23$  กรัมต่อลิตรเป็นผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อบุคคลอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

มาจากการเติมกลีเซอรอลดิบ 5 กรัมต่อลิตร สรุปได้ว่าการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากลีเซอรอลดิบสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C13

คำสำคัญ : กลีเซอรอล, กระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล, สภาวะไร้ออกซิเจน, *Clostridium* sp.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Butanol production from glycerol by isolated of bacteria
Students	Chanisara Deepoom Student ID 58050730 Chonnikan Khonhan Student ID 58050732 Natthaphong Charasri Student ID 58050751
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst. Prof. Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

### Abstract

Butanol is a biofuel that has a tendency to be a renewable energy with similar fuel properties to gasoline and can be synthesized from acetone-butanol-ethanol fermentation (ABE) of *Clostridium* sp. This microorganism can use a variety of carbon sources such as glucose. This study focused on using pure and crude glycerol, a by-product from biodiesel production, as a carbon source. From previous study, nine isolates of *Clostridium* sp. were proved that they could utilize pure glycerol and produce ABE. In this study, they were validated for gram classification, endospore and ABE production from glycerol and it has been found that they were gram-positive, rod shaped and endospore forming. Moreover, to ensure the safety in workplace, these cultures were investigated for the hemolysis. The result showed no hemolysis in all 9 isolates. All isolates are cultivated in T6 medium with 30 g/L pure glycerol, to examine the potential of acetone-butanol-ethanol production. It was found that C13 isolate produced the highest butanol concentration ( $2.66 \pm 0.17$  g/L) in 72 h. Therefore, C13 was selected to study for the optimal concentration of glycerol. The optimum concentration of pure glycerol (10-50 g/L) was studied and the maximum butanol concentration ( $3.26 \pm 0.30$  g/L) was obtained with the addition of 30 g/L glycerol.

Subsequently, crude glycerol was added into T6 medium with the concentration of 1-5 g/L. The butanol concentration of  $2.78 \pm 0.23$  g/L resulted from the addition of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 g/L crude glycerol. In conclusion, this study showed that crude glycerol could be used as a carbon source in the production of ABE with C13 isolate.

**Keywords :** Acetone-Butanol-Ethanol fermentation, *Clostridium* sp., Crude glycerol, Pure glycerol, Isolation of anaerobic



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา รวมทั้งระยะเวลาในการให้คำปรึกษา และแนะแนวทางให้ความคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา ทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและครบถ้วน โดยเฉพาะอย่างยิ่งท่านคอยชี้แนะแนวทางเมื่อเกิดปัญหา สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ในการวางแผนงานต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากและคอยสอบถามติดตามความคืบหน้าด้วยความเอาใจใส่อย่างดีเสมอมา ตลอดจนให้กำลังใจในการทำโครงการพิเศษและการนำเสนอ และขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุลและ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ซึ่งเป็นกรรมการสอบโครงการพิเศษนี้ ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความเรียบร้อย และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ทางผู้จัดทำตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.กานต์ วงศาริยะ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการเตรียมอาหาร blood agar base ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญส่วนหนึ่งในการทดลองและ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการใช้เครื่อง HPLC รวมทั้งช่วยแก้ไขปัญหาระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชา อบรมสั่งสอนให้ความรู้ทาง ด้านวิชาการ รวมทั้งสอนประสบการณ์ให้กับคณะผู้จัดทำตลอดจนโครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณบริษัท บางจากไบโอฟูเอล จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์และเอื้อเฟื้อ กลีเซอรอลเพื่อให้ทางผู้จัดทำนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาและทำโครงการพิเศษในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวเป็นอย่างสูง ตลอดทั้งเพื่อนๆ ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจ ที่คอยช่วยเหลือและให้การสนับสนุนทำโครงการพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ได้ไม่น้อยแก่บุคลากรทางการศึกษาและผู้สนใจทั่วไป คุณค่าและประโยชน์ของรายงานฉบับนี้ คณะผู้จัดทำจึงขอมอบส่วนดีให้เป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บุรพอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ผู้จัดทำเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้

ชณิสรา ดีพุ่ม

ชณิกานต์ คนหาญ

ณัฐพงษ์ ชราศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ.....	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 คุณสมบัติทั่วไป.....	3
2.1.2 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว.....	4
2.1.3 การสังเคราะห์บิวทานอล.....	5
2.1.3.1 การสังเคราะห์บิวทานอลชีวภาพด้วยวิธีทางเคมี.....	5
2.1.3.2 การสังเคราะห์บิวทานอลชีวภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.....	6
2.1.4 ชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล.....	7
2.2 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol ,.....	9
ABE Fermentation).....	9
2.2.1 ประวัติและที่มาของกระบวนการ ABE.....	9
2.2.2 จุลินทรีย์.....	9
2.2.3 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation).....	11
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE.....	14
Fermentation).....	14
2.3.1 สารตั้งต้น.....	14
2.3.2 การกระตุ้นการออกของสปอร์ด้วยความร้อน.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3 ระดับความเป็นกรดต่าง (pH).....	15
2.3.4 อุณหภูมิ.....	15
2.3.5 สารอาหารและบัฟเฟอร์.....	16
2.3.6 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย.....	16
2.3.7 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์.....	16
2.4 กลีเซอรอล.....	17
2.4.1 การสังเคราะห์กลีเซอรอล.....	18
2.4.1.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลหรือจาก อุตสาหกรรมน้ำมัน.....	18
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>22</b>
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	22
3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	22
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	22
3.1.3 กลีเซอรอลดิบ.....	22
3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	22
3.1.5 สารเคมี.....	23
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	24
3.2.1 การเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง.....	24
3.2.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อตัวอย่าง.....	24
3.2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง.....	24
3.2.4 การทดสอบความสามารถในผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล.....	24
3.2.5 การหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล.....	25
3.2.6 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบ.....	25
3.3 การวิเคราะห์ทางเคมี.....	26
3.3.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล.....	26
3.3.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลงานวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง.....</b>	<b>27</b>
4.1 การยืนยันเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากกลีเซอรอลได้	27
4.1.1 รูปร่างและลักษณะของเชื้อที่นำมาทดลอง.....	27
4.1.2 ผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง .....	30
4.1.3 การคัดเลือกเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลผลิตบิวทานอลได้.....	34
4.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล .....	36
4.3 การหาความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล.....	39
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>43</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	43
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	44
<b>เอกสารอ้างอิง .....</b>	<b>45</b>
<b>ภาคผนวก .....</b>	<b>49</b>
ภาคผนวก ก.....	50
ภาคผนวก ข.....	52
ภาคผนวก ค.....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล.....	4
2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล แก๊สโซลีน และเอทานอล .....	5
2.3 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอล .....	17
4.1 รูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	27
4.2 ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง Blood agar base โดยวิธี Streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน.....	31
4.3 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน .....	35
4.4 ปริมาณความเข้มข้นตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C11 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่สนใจทุก 12 ชั่วโมง.....	37
4.5 ปริมาณความเข้มข้นตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C13 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่สนใจทุก 12 ชั่วโมง.....	38
4.6 การผลิตตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C13 โดยใช้อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	40
4.7 เชื้อแบคทีเรีย C13 โดยใช้อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง .....	41
ข.1 พื้นที่ได้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ .....	53
ข.2 พื้นที่ได้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ .....	55
ข.3 พื้นที่ได้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ .....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับควรได้แจ้งเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่เอื้ออำนวยให้แก้ไขโดยไม่ได้รับอนุญาต 57

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.4 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์.....	59
ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่นำมา คัดเลือก 9 สายพันธุ์.....	61
ค.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอลในอาหาร T6 ที่เติม กลีเซอรอลบริสุทธิ์ของเชื้อที่สนใจได้แก่ C11 และ C13 ตามช่วงระยะเวลาที่สนใจ นั่นคือ 0 12 24 36 48 60 72 96 และ 120 ชั่วโมง.....	67
ค.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอลในอาหาร T6 ที่ใช้ ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบ ของเชื้อ C13 ในชั่วโมงที่ 0 และ 72 .....	79



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของบิวทานอล .....	3
2.2 การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (ก) Oxo synthesis , (ข) Reppe process และ (ค) Crotonaldehyde hydrogenation.....	7
2.3 กลไกการหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	8
2.4 ลักษณะของ <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052 .....	10
2.5 วิธีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	12
2.6 โครงสร้างของกลีเซอรอล .....	17
2.7 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช .....	19
4.1 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือก ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน.....	36
4.2 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย C11 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	38
4.3 เชื้อแบคทีเรีย C13 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....	39
4.4 ความเข้มข้นบิวทานอล ของเชื้อ C13 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ใน ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	41
4.5 ความเข้มข้นบิวทานอลที่ผลิตได้ของเชื้อ C13 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบใน ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	42
ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดย คำนวณอัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟบิวทานอลต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก.....	53
ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณ อัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก .....	55
ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณ อัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟอะซิโตนต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก .....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปรภาพ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

ข.4 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลมาตรฐาน ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ได้กราฟจากพื้นที่ได้กราฟกลีเซอรอลต่อพื้นที่ได้กราฟกรดซิตริก.....59



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมีปริมาณการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้น โดยแหล่งที่มาหลักของพลังงานเชื้อเพลิง คือ ฟอสซิลซึ่งนับวันปริมาณฟอสซิลที่มีอยู่ใต้ผิวโลกเริ่มหมดลงพลังงานที่ได้จากฟอสซิลยังเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของโลก ดังนั้น พลังงานทางเลือกจึงเป็นทางออกเพื่อแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพลังงานที่จะมีขึ้นในอนาคตข้างหน้าและยังเป็นพลังงานที่สะอาดไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) ที่หลากหลาย เช่น ไบโอดีเซล ซึ่งเป็นพลังงานชีวภาพชนิดหนึ่งที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรงหรือนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่า “แก๊สโซฮอล์ (Gasohol)” และนำไปผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า “ดีเซลโซฮอล์ (Desohol)” อย่างไรก็ตามมีเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวอีกตัวหนึ่งที่มีความสนใจมากขึ้นคือ ไบโอบิวทานอล ซึ่งมีประสิทธิภาพเหนือกว่าเอทานอลในด้านการนำมาใช้เป็นพลังงานมีความร้อนจากการเผาไหม้เท่ากับ  $29.2 \text{ MJ/dm}^3$  ในขณะที่เอทานอลมีค่าเท่ากับ  $19.6 \text{ MJ/dm}^3$  (Kaminski และคณะ, 2011) บิวทานอลมีค่าออกเทนอยู่ที่ 96 ซึ่งเหมาะสมกับการใช้งานกับเครื่องยนต์มีความดันไอและความสามารถในการกักต่อน้อยกว่าเอทานอลจึงสามารถขนส่งทางท่อได้ทำให้สามารถลดต้นทุนในเรื่องของการขนส่งและที่สำคัญสามารถผลิตไบโอบิวทานอลจากชีวมวลประเภทเดียวกันกับการผลิตไบโอดีเซล

กลีเซอรอลดิบเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะมีกำลังการผลิตไบโอดีเซลเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นตามหากมีการทิ้งสารที่มีกลีเซอรอลดิบลงในแหล่งน้ำหรือดินอาจส่งผลให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นควรนำกลีเซอรอลดิบที่เกิดขึ้นจำนวนมากมาใช้ประโยชน์ ไม่ทางตรงหรือทางอ้อมหรือควรจะถูกนำมาดัดแปลงหรือปรับปรุงเพื่อเพิ่มมูลค่าด้วยการเปลี่ยนให้เป็นสารใหม่ที่มีมูลค่าสูงและไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม การเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น ไฮโดรเจน เอทานอล หรือ มีเทน จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการช่วยลดมลพิษที่จะเกิดกับสิ่งแวดล้อมอีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและทำให้เกิดการใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอลเพื่อสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทางเลือกในอนาคต

ดังนั้นโครงการพิเศษนี้จึงใช้แบบที่เรียกในกลุ่มคลอสทริเดียที่ได้จากการคัดแยกเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการจากการศึกษาที่ผ่านมา (ก้องกิตติกร และปพิชญา, 2560) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและเพื่อลดปริมาณของเสียจากการผลิตไบโอดีเซล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ทำการหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลดิบจากโรงงานผลิตน้ำมันไบโอดีเซลที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตบิวทานอล

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการยืนยันแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนจากเชื้อที่ถูกคัดแยกแล้วจากแหล่งดินเพาะปลูกทางการเกษตร 9 สายพันธุ์โดยใช้อาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์และทำการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแกะโดยใช้อาหาร Blood agar base จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Reinforced Clostridium Medium (RCM) จากนั้นทำการทดลองหาความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลดิบจากโรงงานผลิตน้ำมันไบโอดีเซลที่เหมาะสมและทดสอบคุณสมบัติในการผลิตบิวทานอล

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลดิบมาใช้ในการผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด
- 2) ได้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธ์และกลีเซอรอลดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

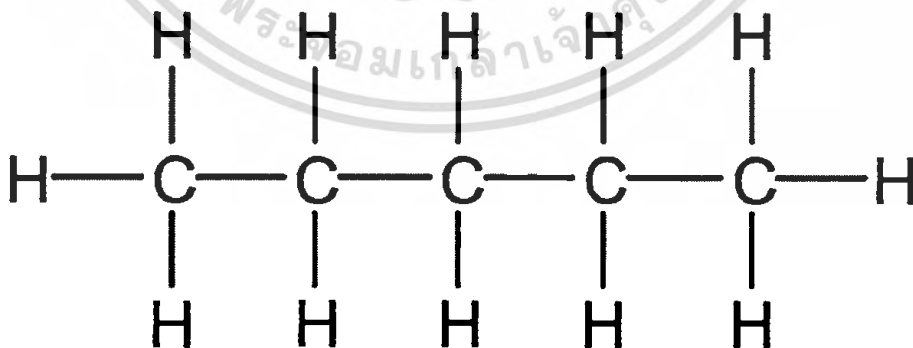
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 บิวทานอล

#### 2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

บิวทานอล (Butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl alcohol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล  $C_4H_9OH$  มีมวลโมเลกุล เท่ากับ 74.12 g/mol บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่จะมีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายคลึงกับกลิ่นของกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่รุนแรง สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้ อาจก่อให้เกิดการเสพติดได้เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูงๆ บิวทานอลมีคุณสมบัติสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดี แต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ (Lee และคณะ, 2008; Durre, 2007) และคุณสมบัติอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 นอกจากนี้ ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับบิวทานอลได้แก่ เมทานอล เอทานอล และโพรพานอล

บิวทานอลนั้นสามารถผลิตได้จากกระบวนการ 3 วิธีด้วยกัน คือ 1. จากกระบวนการทางเคมีที่มาจากน้ำมันหรือไฮโดรคาร์บอน 2. กระบวนการหมัก (Fermentation) จากสารชีวมวลบางชนิด 3. จากกระบวนการขั้นสูง โดยมีสารตั้งต้นจากหลากหลายชนิด แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันที่ทำกันมากคือการหมัก (Fermentation) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มักจะเป็นเชื้อแบคทีเรียในตระกูลของ *Clostridium* (Lee และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบิวทานอล

ที่มา : <http://www.gcsescience.com/o38.htm> (วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของบิวทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล
จุดหลอมเหลว (°C)	-89.3
จุดเดือด (°C)	117.2
อุณหภูมิขณะที่มีการลุกไหม้ (°C)	367
จุดวาบไฟ (°C)	35
ความถ่วงจำเพาะ (g/mL)	0.80
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (°C)	287

ที่มา : Lee และคณะ (2008)

### 2.1.2 การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลว

ไบโอบิวทานอลเป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตทางชีวภาพซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ในอากาศยานใกล้เคียงได้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ด้วยเหตุผลหลายประการ เอทานอลยังคงเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมในปัจจุบันมากกว่าก็ตาม (Hansen และคณะ, 2005; Niven, 2005) อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีข้อดีกว่าเอทานอลหลายประการ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี ตลอดจนคุณสมบัติทางระดับพลังงาน กล่าวคือ ไบโอบิวทานอล มีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนหรือเรียกว่า น้ำมันเบนซิน มากกว่าเอทานอล และบิวทานอลมีความเป็นขี้ดต่ำกว่าจึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบการใช้ในเครื่องยนต์ที่มีปริมาณเท่ากัน พบว่าเครื่องยนต์ใช้บิวทานอลช้ากว่า ซึ่งหมายความว่าใช้เอทานอลหมดเร็วกว่า นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเครื่องยนต์สามารถทำงานได้ปกติ ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์ต้องใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าแก๊สโซลีน 9 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยพวงสารพิษพวกไฮโดรคาร์บอน ไนโตรเจนออกไซด์ และคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงอย่างมาก ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญที่ควรคำนึงต่อสิ่งแวดล้อมของโลก

คุณสมบัติของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล (วรวิทย์, 2558)

1) บิวทานอลมีค่าพลังงานสูงกว่าเอทานอล โดย บิวทานอลมีค่า 110,000 BTU ต่อแกลลอน ในขณะที่ เอทานอลมีค่า 84,000 BTU ต่อแกลลอน

2) บิวทานอลมีค่าการกัดกร่อนต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

3) บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้น (จึงมีค่า Hygroscopicity ต่ำกว่า)

ไม่ว่ากรณีใดๆ หวังสัน อีทิงห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) การใช้บิวทานอลปลอดภัยกว่าเอทานอล เนื่องจากมีค่าการติดไฟ (Flash Point) สูงกว่า (35 °C และ 14°C ตามลำดับ) และมีค่าแรงดันเป็นไอต่ำกว่า

5) มีค่าออกเทนสูงกว่า

6) การระเหย (Volatility) ต่ำกว่าจึงเป็นพิษน้อยกว่า (มีค่า Reid Vapor Pressure (RVP) ต่ำกว่า 7.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล)

7) สามารถผสมรวมกับทั้งแก๊สโซลีนและดีเซลได้สมบูรณ์

ดังนั้นจากที่กล่าวมา เห็นได้ว่าการใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีความปลอดภัยมากกว่า ทั้งนี้ บิวทานอลยังไม่ส่งผลกระทบต่อการเติมรวมถึงระบบการจัดเก็บเชื้อเพลิงเหลวเหล่านี้ และการที่ค่าแรงดันการเป็นไอ (Vapor Pressure) ของบิวทานอลมีค่าต่ำกว่าเอทานอล 11 เท่า ซึ่งบิวทานอลมีค่าแรงดันการเป็นไอเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอทานอลมีค่าแรงดันการเป็นไอ 45 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส จากคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของบิวทานอลทำให้สะดวกต่อการผสมกับแก๊สโซลีน สามารถเติมโดยตรงกับแก๊สโซลีนโดยไม่มีการระเหย และไม่มีการแยกชั้นกับน้ำเนื่องจากมีการปนของน้ำน้อยมาก แต่มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนซึ่งสามารถเติมสารเพิ่มค่าออกเทนได้ เมื่อเปรียบเทียบการผสมเชื้อเพลิงชีวภาพอื่นๆ กับแก๊สโซลีน (ตารางที่ 2.2) (Durre และคณะ,2007)

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล แก๊สโซลีน และเอทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล	แก๊สโซลีน	เอทานอล
ความหนาแน่นพลังงาน (MJ/L)	29.2	32	19.6
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันและอากาศ	11.2	14.6	9
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92
ปริมาณพลังงาน (BTU/gal)	110,000	115,000	84,000
ความสามารถในการละลายน้ำ 100 กรัม	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย
ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย (RON)	96	91-99	129
ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ (MON)	78	81-89	102

ที่มา : Lee และคณะ (2008) ; Davis และ Morton (2008)

## 2.1.3 การสังเคราะห์บิวทานอล

### 2.1.3.1 การสังเคราะห์บิวทานอลชีวภาพด้วยวิธีทางเคมี

บิวทานอลที่ถูกผลิตขึ้นในระดับอุตสาหกรรมนั้นส่วนใหญ่จะผลิตจากกระบวนการทาง

เคมี 3 กระบวนการ ได้แก่ Oxo process, Reppe process และ Crotonaldehyde hydrogenation \* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (รูปที่ 2.2) ในการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Oxo (Hydroformylation) นั้นต้องมีการเติม Carbon

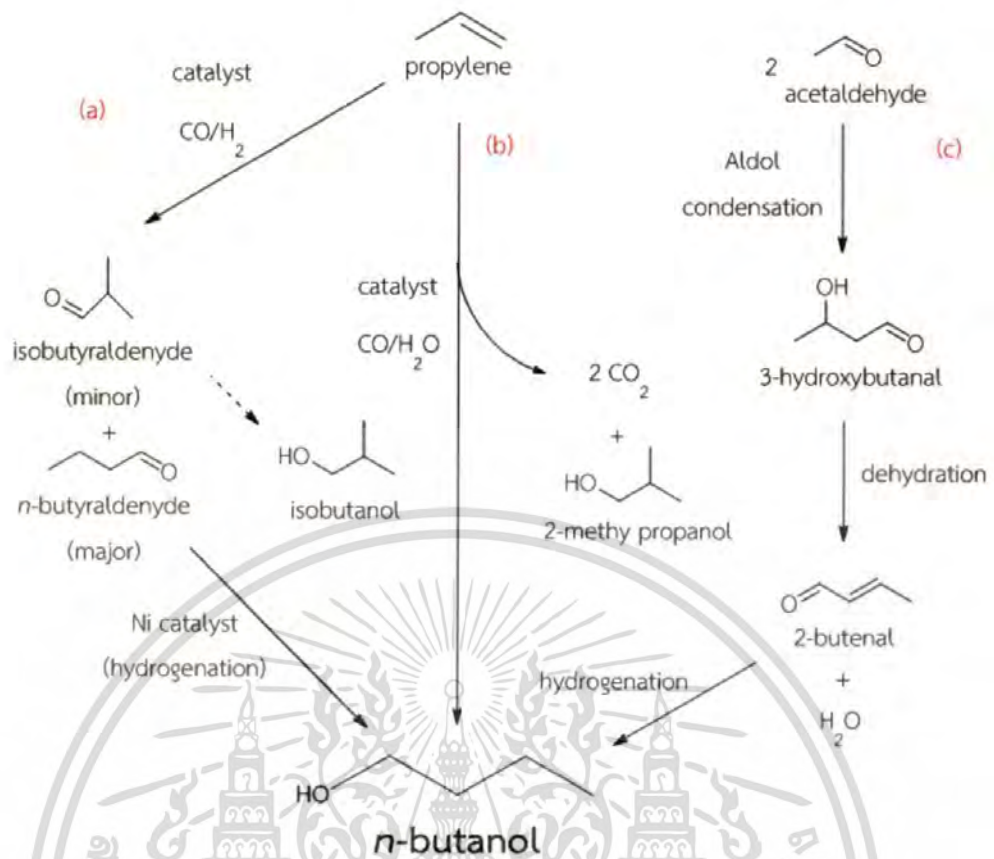
ไม่จำกัดใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

monoxide และ Hydrogen เพื่อเข้าไปแทนที่หมู่ Hydrocarbonyl อย่างต่อเนื่อง โดยมีโลหะจำพวก Co, Rh หรือ Ru เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง Aldehyde ที่เกิดขึ้นในระยะแรก จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็น บิวทานอลในกระบวนการ Hydrogenation ต่อไป ทั้งนี้ความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับ ความดัน อุณหภูมิ และชนิดของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย โดยบิวทานอลที่ได้จากปฏิกิริยานี้ จะได้ Isomer ที่แตกต่างกันหลายชนิด ส่วนการสังเคราะห์บิวทานอลผ่านกระบวนการ Reppe จะอาศัยการ เกิดปฏิกิริยาร่วมกันของ Propylene, Carbon monoxide และน้ำ ในขณะที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมอยู่ ด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดของผสมของ n-butaldehyde และ Isobutaldehyde ต่อมาจะถูกกลดรูปให้ เปลี่ยนเป็นบิวทานอล การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธี Reppe นี้ จะทำให้ได้บิวทานอลโดยตรง ไม่ ผ่านตัวกลาง ภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีนี้ ไม่สามารถผลิตได้ในเชิงการค้า เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและเทคโนโลยีที่ทันสมัยซึ่งมีราคาแพง จนกระทั่งเมื่อสิบปีที่ผ่านมาได้มีการผลิตบิวทานอลจาก Acetaldehyde ผ่านกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation ประกอบไปด้วยขั้นตอน Aldol condensation, Dehydration และ Hydrogenation (Bochman และคณะ, 1999) แม้ว่าจะมีการใช้วิธีนี้ในการผลิตบิวทานอลไม่ มากแต่ในอนาคตการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการ Crotonaldehyde hydrogenation นี้ อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจาก Crotonaldehyde สามารถผลิตได้จากเอทานอล โดย กระบวนการ Dehydrogenation ทั้งนี้ เอทานอลสามารถผลิตได้จากสารชีวมวลโดยกระบวนการทาง ชีวภาพ ซึ่งการผลิตบิวทานอลโดยการสังเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีอื่นๆ ต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้น ที่มาจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียม ซึ่งนับวันยิ่งหายากและลดน้อยลง เป็นต้น

#### 2.1.3.2 การสังเคราะห์บิวทานอลชีวภาพด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล ทั้งนี้เอบีอีเป็นกระบวนการที่รู้จักกันดีและเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจนโดยให้ ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะ *Clostridium acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ มากที่สุด รวมทั้ง สายพันธุ์ *Clostridium beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน (อังคณาและคณะ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การสังเคราะห์บิวทานอลด้วยวิธีทางเคมี (ก) Oxo synthesis (ข) Reppe process และ (ค) Crotonaldehyde hydrogenation

ที่มา : [http://asp.plastics.or.th:8001/Article\\_Detail.aspx?id=74](http://asp.plastics.or.th:8001/Article_Detail.aspx?id=74)

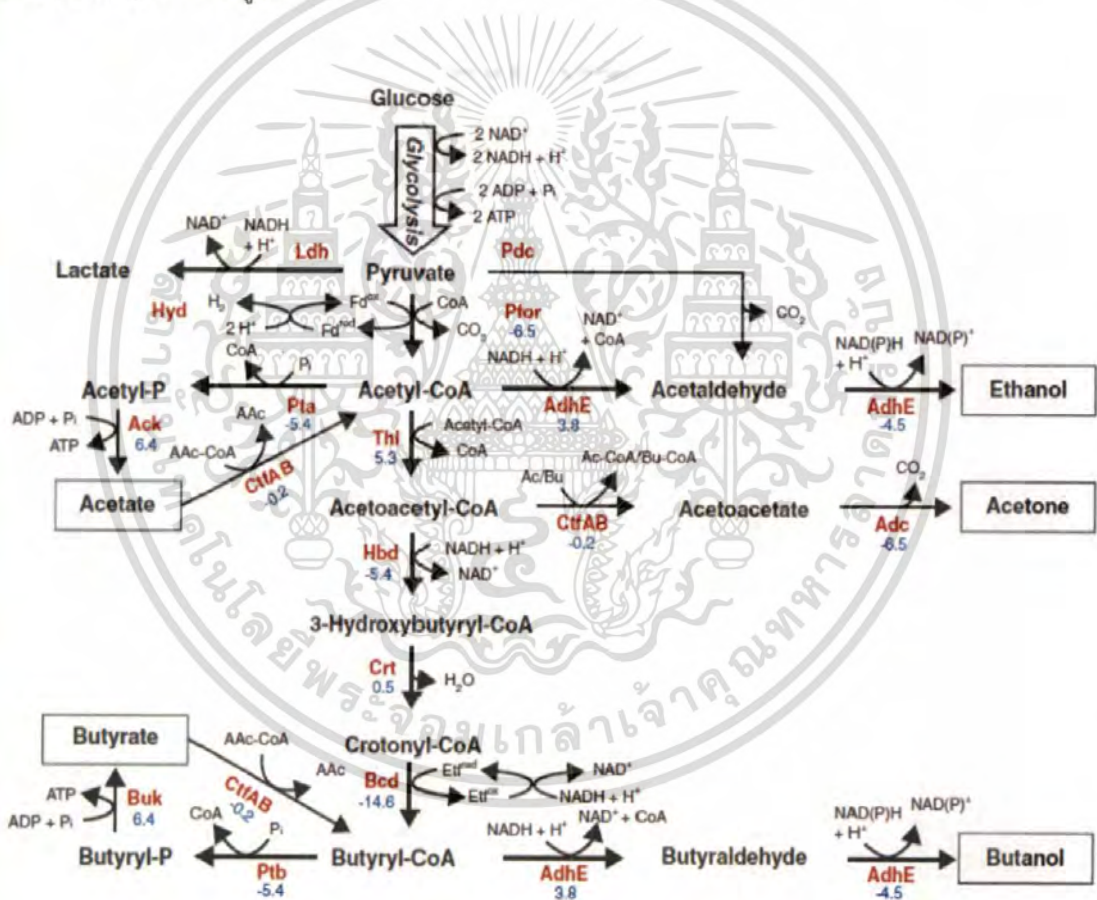
(วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2562)

#### 2.1.4 ชีวเคมีของการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล

ไบโอบิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol (ABE) fermentation) หรือเรียกว่า การหมัก ABE ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้ โดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่นิยมใช้มากที่สุด แบคทีเรียสกุลนี้สามารถสร้างสปอร์ได้และเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria) มีรูปร่างเป็นท่อน ดิดสี่แกรมบวก ซึ่งสามารถตัดแยกได้จากหลากหลายแหล่ง แต่ส่วนใหญ่คัดแยกได้จากดิน ปัจจุบันแบคทีเรียในสกุลนี้ที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* และ *Clostridium pasteurianum* เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Clostridium* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส (Glucose) ซูโครส (Sucrose) แล็กโทส (Lactose) ไซโลส (Xylose) ไซแลน (Xylan) แป้งและกลีเซอรอล (Andrade และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์งานที่อาจารย์ขอสงวนไว้ ไม่ควรเอาไปใช้ในเชิงพาณิชย์โดยไม่ขออนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vasconcelos, 2003; Mitchell, 1998) โดยแหล่งคาร์บอนเหล่านี้สามารถผลิตได้จากชีวมวลที่มีอยู่หลากหลายและมากมาย ซึ่งวัตถุดิบที่สามารถใช้ผลิตไบโอบิวทานอลได้นั้นอธิบายอยู่ในหัวข้อถัดไป กลไกการหมัก ABE ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ การผลิตกรดบิวทิริกและกรดอะซิติกในขั้นตอน Acidogenesis ตามด้วยการผลิตตัวทำละลาย ABE ในขั้นตอน Solventogenesis โดยแบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลาย ABE ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นไพรูเวท จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนเป็นอะซิติกโคเอ, อะซิโตน อะซิติกโคเอ และบิวทาร์ริกโคเอ ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือตัวทำละลายบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล ในสัดส่วน 6:3:1 โดยประมาณ ให้กรดบิวทิริก กรดอะซิติก แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (อังคณาและคณะ, 2553) วิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic pathways) ของการสลายกลูโคสของ *Clostridium* (Ezeji และคณะ, 2007) แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กลไกการหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล *Clostridium acetobutylicum*

ที่มา : [http://asp.plastics.or.th:8001/Article\\_Detail.aspx?id=74](http://asp.plastics.or.th:8001/Article_Detail.aspx?id=74)

(วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE Fermentation)

### 2.2.1 ประวัติและที่มาของกระบวนการ ABE

การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบอะซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์ พาสเตอร์ในปี ค.ศ. 1905 กระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลโดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบีตาไดอินซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตยางสังเคราะห์ ส่วนอะซิโตนนั้นมีความสำคัญในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตวัตถุระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังจากสงครามยุติ ความต้องการอะซิโตนจึงลดน้อยลงแต่กลับมีความต้องการอะซิโตนมากขึ้นเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมสีทา (Jones และ Woods, 1986)

ความสำคัญของกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวโดยกระบวนการหมักเริ่มลดลงภายหลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่กลับมาเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นในปี ค.ศ. 1973 และปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้นแต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวก็ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูงอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones และ Woods, 1986)

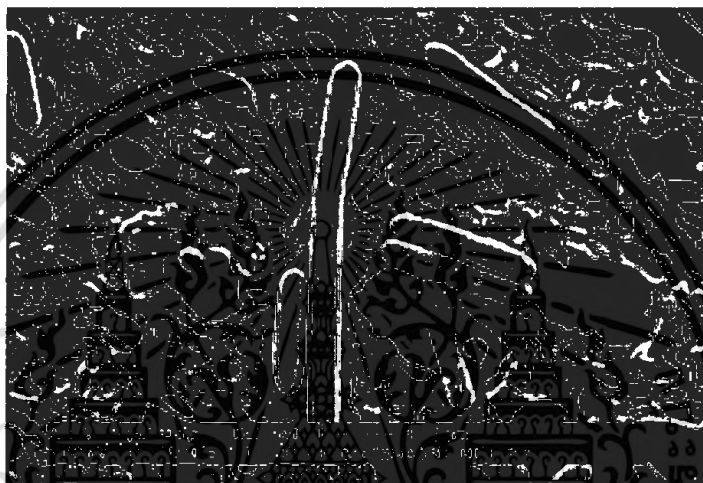
### 2.2.2 จุลินทรีย์

*Clostridium* เป็นชื่อสกุลของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) อยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ *Bacillus* sp. และ *Desulfotomaculum* sp. มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod shape) สร้างสปอร์ (Spore forming bacteria) ไม่ต้องการอากาศ (Anaerobic bacteria) เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร (Microbial spoilage) สามารถสร้างกรดบิวทริก (Butyric acid) ได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และบางสายพันธุ์มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า

คลอสทริเดียม (*Clostridium* sp.) จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe bacteria) ซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการหมักโดยสามารถลดต้นทุนของการใช้ไบโพดเพื่อให้อากาศ เนื่องจากปกติราคาไบโพดในถังหมักมักมีราคาค่อนข้างสูง มีราคาเป็นครึ่งหนึ่งของราคาถังหมัก แบคทีเรียชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (Rod shape) และสามารถสร้างสปอร์ได้ (Spore forming bacteria) โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งรีและกลม สามารถพบการกระจายของสปอร์ได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น น้ำ ดิน ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ และยังมีคุณสมบัติในการหมักแป้ง เซลลูโลส และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล ซึ่งการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ในวงประชุมวิชาการระดับปริญญาโทและปริญญาเอกเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตบิวทานอลสูงขึ้น จึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย *Clostridium* sp. พบว่านอกจากบิวทานอลแล้วแบคทีเรียยังมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอื่นคือ เอทานอลและอะซิโตน เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพร้อมกับการผลิตบิวทานอลและเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆได้ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพ งานวิจัยด้านการหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลวถือว่าเป็นงานที่น่าสนใจอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทางแถบยุโรป ซึ่งกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงเหลวเป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ ABE Fermentation (Tashiro และคณะ,2005 ; Virunanon และคณะ, 2008)



รูปที่ 2.4 ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052

ที่มา : <http://rldc.anamai.moph.go.th/index.php> (วันที่สืบค้น 1 กรกฎาคม 2562)

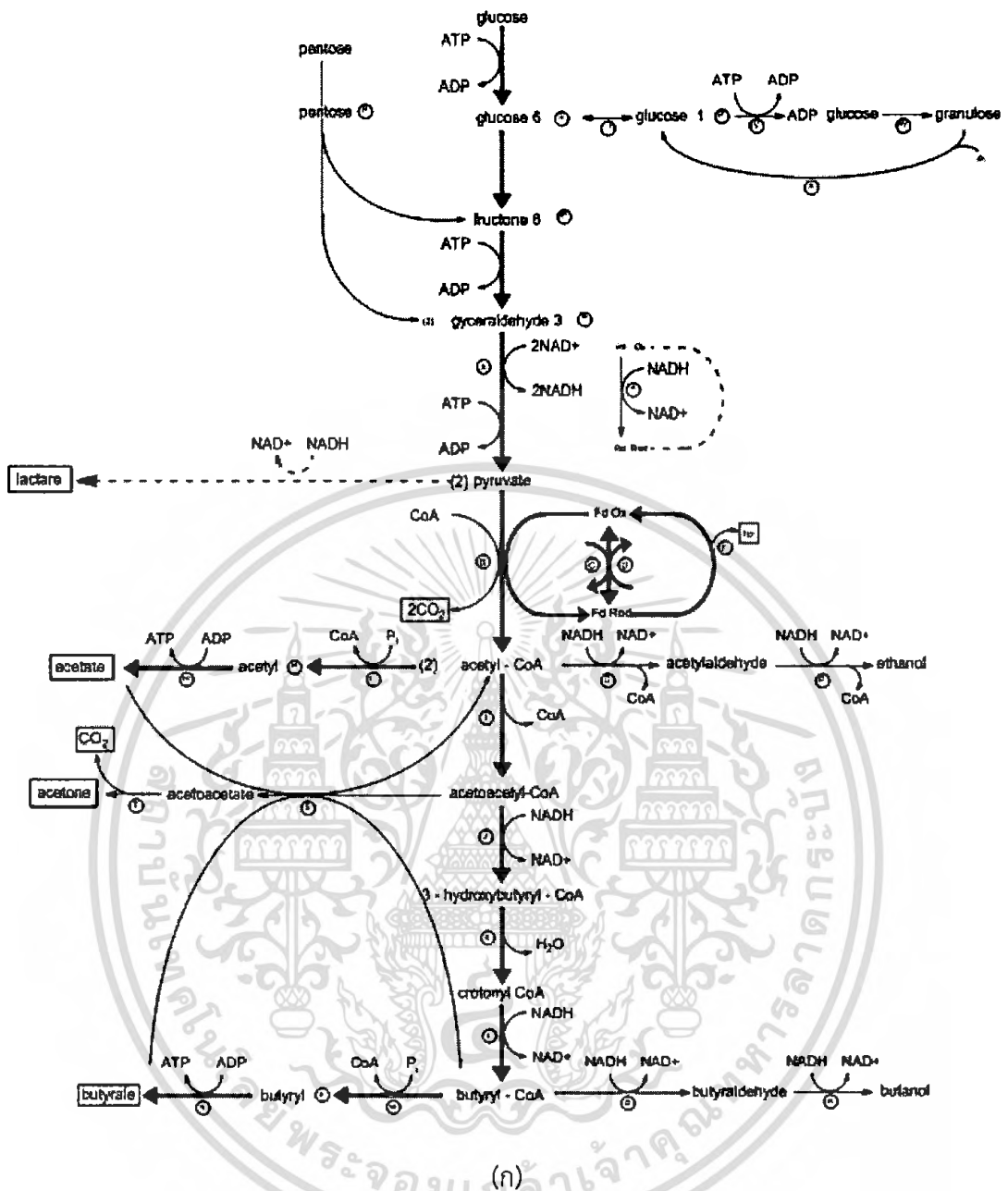
*Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนสั้น ดังแสดงในรูปที่ 2.4 สามารถเคลื่อนที่ได้ซึ่งทำการแยกได้จากอุจจาระและในดินจะมีการสร้างสปอร์เป็นรูปท่อน มีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ในระดับอุตสาหกรรมจะถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ เช่น บิวทานอล อะซิโตนและไอโซโพรพานอล ณ สภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสจะมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีความหลากหลาย (ไม่จำกัดจำนวน) ซึ่งรวมถึงเพนโตส เฮกโซสและแปงซอติของแบคทีเรียชนิดนี้คือมีความสามารถในการเติบโตที่ง่าย ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาไม่แพงในการเพาะเลี้ยงมีความเสถียรของสายพันธุ์ที่ทนต่อการเสื่อมสภาพ มีการปรับตัวดีในกระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องและตัวทำละลายจะทำงานได้ดีในระยะ Log Phase เป็นต้น *Clostridium beijerinckii* สามารถหมักแป้งได้เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่และได้อะซิโตนและเอทานอลเป็นส่วนน้อยนอกจากนี้ *Clostridium beijerinckii* บางสายพันธุ์จะผลิตไอโซโพรพานอลออกมาด้วยนอกเหนือจากอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.3 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในภาพที่ 2.5ก และ 2.5ข ทั้งนี้ น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ NADH+ H<sup>+</sup> จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก Metabolized ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์และ Reduce ferredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvateferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้น จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมักโดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ย้อนกลับไม่ได้ ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษและช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD<sup>+</sup> ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD<sup>+</sup> แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH+ H<sup>+</sup> ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD<sup>+</sup> ด้วย (Jones และ Woods, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

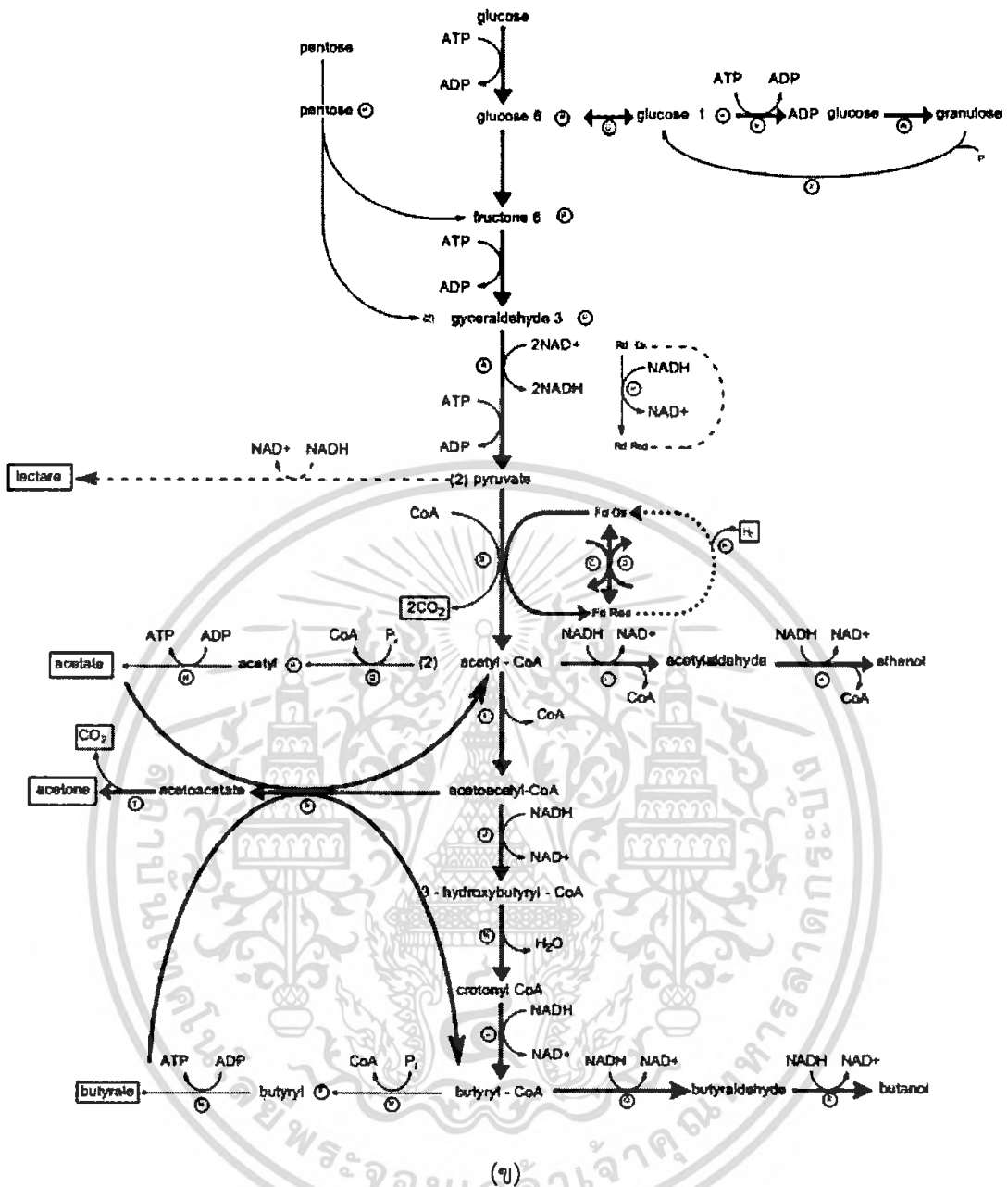


รูปที่ 2.5 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

(ก) ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase)

(ข) ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 (ต่อ) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

(ก) ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase)

(ข) ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

ที่มา : Jones และ Woods (1986)

หมายเหตุ : เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร:

(ก) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (ฐ) phosphate butyltransferase

เอกสาร (ข) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase การศึกษาเท่าที่ (ค) butyrate kinase ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่า (ด) NADH-ferredoxin oxidoreductase อ้อหาและต้องอ้อ (ด) acetaldehyde dehydrogenase ไปใช้

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| (ง) NADPH ferredoxin oxidoreductase         | (ณ) ethanol dehydrogenase            |
| (จ) NADH rubredoxin oxidoreductase          | (ด) butyraldehyde dehydrogenase      |
| (ฉ) hydrogenase                             | (ต) butanol dehydrogenase            |
| (ช) phosphate acetyltransferase             | (ถ) acetoacetyl-CoA /CoA transferase |
| (ซ) acetate kinase                          | (ท) acetoacetate decarboxylase       |
| (ณ) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase) | (ธ) phosphoglucomutase;              |
| (ญ) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase      | (น) ADP-glucose pyrophosphorylase    |
| (ฎ) crotonase                               | (บ) granulose (glycogen) synthase    |
| (ฏ) butyryl-CoA dehydrogenase;              | (ป) granulose phosphorylase          |

## 2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE Fermentation)

### 2.3.1 สารตั้งต้น

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นหลายชนิด เช่น กากน้ำตาล หางนมและข้าวโพด โดยที่ราคาของสารตั้งต้นเป็นปัจจัยหลักที่มีผลเชิงเศรษฐศาสตร์ต่อการผลิตบิวทานอลโดย Robinson (1922) ศึกษาการใช้กากน้ำตาลหลายชนิดในกระบวนการผลิต ABE พบว่า *Granulobacter butylicum* (ภายหลังเปลี่ยนเป็น *Clostridium* sp.) มีการใช้น้ำตาล Glucose, Fructose, Mannose, Sucrose, Lactose, Starch และ Dextrin ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนน้ำตาล Galactose, Xylose, Arabinose raffinose melezitose, Insulin และ Mannitol ถูกใช้เพียงบางส่วน สำหรับน้ำตาล Trehalose, Rhamnose, Melibiose และ Glycerol นั้นพบว่า *Granulobacter butylicum* ไม่สามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้ และยังมีงานวิจัยอีกจำนวนมากได้ทำการศึกษากระบวนการผลิต ABE จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร Spray-dried soy molasses (SDSM) ถูกใช้ในกระบวนการผลิต ABE โดยใช้ *Clostridium beijerinckii* BA-101 ในกระบวนการหมักแบบกะ (Qureshi และคณะ, 2001) ผลการทดลองพบว่า SDSM สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก ABE ได้เมื่อมีการเติมน้ำตาล เช่น Glucose หรือ Sucrose นอกจากนี้ Qureshi และคณะ (2006) ผลิต ABE จาก Corn fiber xylan ได้ผลได้ของ ABE 0.41 กรัมต่อกรัมของสารตั้งต้น

### 2.3.2 การกระตุ้นการงอกของสปอร์ด้วยความร้อน

แบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถสร้างสปอร์ได้ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์ เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียจะหยุดชะงักจนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะงอกใหม่เป็นเซลล์ปกติ การงอกของสปอร์จะเกิดได้เร็วขึ้นเมื่อใช้ความร้อน Hartmanis และ Gatenbeck (1984) ทำการกระตุ้นการงอกของสปอร์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อใช้ในการผลิตบิวทานอลจากอาหารอุดมที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร Ezeji และคณะ (2007) ทำการกระตุ้นการงอกของสปอร์ *Clostridium beijerinckii* BA 101 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้ในการผลิตบิวทานอลจากแป้งข้าวโพด Qureshi และคณะ (2008) ทำการกระตุ้นการงอกของสปอร์ *Clostridium beijerinckii* P260 ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อใช้ในการผลิตบิวทานอลจากฟางข้าว

### 2.3.3 ระดับความเป็นกรดต่าง (pH)

ความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการหมักเอบีอี ในช่วง Acetogenesis phase แบคทีเรียจะผลิตกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกขึ้นเป็นผลให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลง กรดอะซิติกและกรดบิวทีริกเป็นกรดอินทรีย์อย่างอ่อน โดยธรรมชาติแล้วจะเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปที่ไม่แตกตัว (Kell และคณะ, 1981) ที่ระดับความเข้มข้นของกรดสูงๆ ค่าความเป็นกรดต่างที่ผิวของเยื่อหุ้มจะลดลง ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ ภายในตัวเซลล์จะมีการสะสมของกรดและการมีค่าความเป็นกรดต่างลดลง เมื่อค่าความเป็นกรดต่างลดลงจนถึงจุดวิกฤติ การหมักจะเปลี่ยนจากช่วง Acetogenesis phase ไปเป็น Solventogenesis phase โดยกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอบีอี (Jones และ Woods, 1986)

ค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะในการหมัก *Clostridium acetobutylicum* DSM 1732 สามารถผลิตเอบีอีที่ความเป็นกรดต่างประมาณ 5.0 (Andresch และคณะ, 1983) Kim และคณะ (1984) รายงานว่าไม่มีการผลิตเอบีอีที่ความเป็นกรดต่าง 5.8 โดย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 แต่จะมีการผลิตเอบีอีได้ดีที่ความเป็นกรดต่าง 4.5 ในการหมักแบบกะ George และ Chen (1983) รายงานว่าในการหมักบิวทานอลแบบกะโดย *Clostridium beijerinckii* VPI 13436 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรดต่าง 6.8 จะสามารถเร่งการผลิตเอบีอีได้เร็วขึ้น

### 2.3.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อกระบวนการหมักเอบีอี โดยมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอัตราผลผลิตตัวทำละลายและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น McCutchan และ Hickey (1954) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอบีอีอยู่ในช่วงระหว่าง 30 - 33 องศาเซลเซียส แต่การผลิตจะลดลง 23 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส Jones และ Woods (1986) พบว่าผลได้เอบีอีลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะการลดลงของอะซิโตน อุณหภูมิไม่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.5 สารอาหารและบัพเฟอร์

มีรายงานว่าการใช้คาร์บอนในปริมาณมากเกินไปภายใต้สภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัดสามารถเพิ่มการผลิตเอปียีได้ (Madihah และคณะ, 2001) นอกจากนี้เหล็กเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเปลี่ยนโพรวูเวทเป็นอะซิติลโคเ โดยมีความเกี่ยวข้องกับ Ferredoxin oxidoreductase iron-sulfur protein (Kim, 1988) Lee และคณะ (2008) รายงานว่า Clostridia ของ *Clostridium acetobutylicum* สูญเสียความสามารถในการผลิตเอปียีในระหว่างการหมัก (Degeneration) เนื่องจากการสูญเสีย Megaplasmid pSOLL และสามารถป้องกันได้โดยทำการหมักภายใต้สภาวะที่มีฟอสเฟตจำกัด Chen และ Blaschek (1999) รายงานว่าการเกิด Degeneration ใน *Clostridium Beijerinckii* BA 101 สามารถป้องกันได้โดยการเติมโซเดียมอะซิเตต Bryant และ Blaschek (1988) รายงานว่าการเพิ่มบัพเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีการที่ง่ายในการเพิ่มการเจริญและการใช้คาร์โบไฮเดรตได้เท่าๆ กับเพิ่มการผลิตบิวทานอล

### 2.3.6 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย

ปัญหาที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งในการหมักเอปียี คือ ปัญหาเรื่องความเป็นพิษของตัวทำละลายที่ผลิตได้ กระบวนการเมแทบอลิซึมของ Clostridia จะหยุดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายมีค่า 20 กรัมต่อลิตรหรือมากกว่า (Woods, 1995) ทำให้ต้องใช้สารตั้งต้นคาร์บอนที่ความเข้มข้นจำกัดในกระบวนการหมัก และเป็นผลทำให้ตัวทำละลายที่ผลิตได้มีความเข้มข้นต่ำ บิวทานอลมีความเป็นพิษสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นโดยทำให้องค์ประกอบฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์แตกทำให้ของไหลในเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่คงตัวและสูญเสียความสามารถบางอย่างไป เช่น ความสามารถในการขนถ่ายต่างๆ การใช้กลูโคสและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ ATPase (Bowles และ Ellefson, 1985) นอกจากนี้บิวทานอลเป็นตัวทำละลายชนิดเดียวที่ถูกผลิตขึ้นในระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์ระหว่างการหมักด้วย Clostridia (Jones และ Woods, 1986)

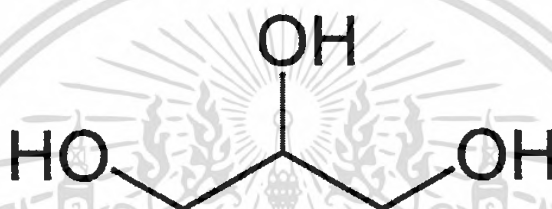
### 2.3.7 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์

ค่าใช้จ่ายที่สูงในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เป็นอีกปัญหาหนึ่งในกระบวนการผลิตบิวทานอลทางชีวภาพ นอกจากการกลั่นซึ่งเป็นกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์แบบดั้งเดิมแล้วยังมีกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์แบบอื่นถูกพัฒนาขึ้นมา เช่น เพอร์เวปเปอร์เรชัน (Qureshi และ Blaschek, 1999, Qureshi และคณะ 2001, Liu และคณะ, 2005) การดูดซึม (Ennis และคณะ, 1987) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Qureshi และ Maddox, 2005) การแยกด้วยแก๊ส (Qureshi และ Blaschek, 2005) และรีเวิร์สออสโมซิส (Garcia และคณะ, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 กลีเซอรอล

กลีเซอรอล (Glycerol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า กลีเซอริน (Glycerin) เป็นชื่อที่มาจากคำในภาษากรีกว่า lykys หมายถึง ความหวานกลีเซอรอลมีลักษณะเป็นของเหลวใส หนืด ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ มีรสหวานเล็กน้อย กลีเซอรอลเป็นสารจำพวกโพลีไฮดริกแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) ที่มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_3H_8O_3$  มีน้ำหนักโมเลกุล 92.09 กรัมต่อโมล และมีชื่อทางเคมีว่า 1,2,3-โพรเพนไตรออล (1,2,3-Propanetriol) จากภาพโครงสร้างของกลีเซอรอลดังแสดงในรูปที่ 2.6 พบว่า กลีเซอรอลประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ซึ่งใน 2 หมู่เป็นของไฮดรอกซิลปฐมภูมิ (Primary hydroxyl) และหมู่ไฮดรอกซิลทุติยภูมิ (Secondary hydroxyl) 1 หมู่



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของกลีเซอรอล

ที่มา : [http://www.bareo-isyss.com/66/66\\_glycerine.html](http://www.bareo-isyss.com/66/66_glycerine.html) (วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2562)

### ตารางที่ 2.3 สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอล

สมบัติทางกายภาพและเคมี	ข้อมูล
สูตรทางเคมี	$CH_2OH-CHOH-CH_2OH$
น้ำหนักโมเลกุล	92.09 g/mol
สถานะและสี	ของเหลว ไม่มีสี
ความถ่วงจำเพาะ	1.2605
ค่าดัชนีหักเหแสง	1.4746
จุดหลอมเหลว	$17.9^{\circ}C$
จุดเดือด	$290^{\circ}C$
น้ำ	ละลายดีมาก
แอลกอฮอล์	ละลายดีมาก
อีเทอร์	ไม่ละลาย

ที่มา : Jones และ Woods (1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกลีเซอรอลแสดงในตารางที่ 2.3 พบว่า กลีเซอรอลละลายได้ดีทั้งในน้ำ เมทานอล เอทานอล ไอโซเมอร์ของโพรพานอล บิวทานอล เพนทานอลรวมทั้งฟีนอลไกลคอลโพรเพนไดออลเอมีน และสารประกอบที่เป็นเฮเทอโรไซคลิก ไดเอทิลอีเทอร์ เอทิลเอสเทอร์และไดออกเซน ไม่ละลายในตัวทำละลายจำพวกเฮโลเจน เช่น คลอโรฟอร์ม เป็นต้นดังนั้น การที่กลีเซอรอลละลายได้ในสารหลายประเภทจึงถูกใช้เป็นตัวทำละลาย ที่มีประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมยา อาหารและเครื่องสำอาง เป็นต้น นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังสามารถทำปฏิกิริยาได้เหมือนกับแอลกอฮอล์

การผลิตกลีเซอรอลมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี เช่น ผลิตได้จากการหมักด้วยจุลินทรีย์หรือผลิตจากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้วัตถุดิบจากปิโตรเคมีหรือผลิตจากผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตสบู่จากไขมันหรือผลิตมาจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม คือ กลีเซอรอล ในอดีตกลีเซอรอลส่วนใหญ่ผลิตจากการทำสบู่ เนื่องจากปัญหาคาบน้ำมันดิบที่มีมูลค่าสูงขึ้นทำให้มีการหาแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่หนึ่งในนั้น คือ การผลิตไบโอดีเซล พบว่าในปีค.ศ.1992 ปริมาณการผลิตกลีเซอรอลส่วนใหญ่มาจากสบู่และกรดไขมันและยังไม่มีรายงานของการผลิตกลีเซอรอลจากอุตสาหกรรมไบโอดีเซล ต่อมาในปีค.ศ. 1995 เริ่มมีการผลิตกลีเซอรอลจากไบโอดีเซลแต่ยังมีปริมาณไม่มากจนมาถึงในปีค.ศ. 2010 การผลิตกลีเซอรอลจากไบโอดีเซลมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นมากจนแซงการผลิตกลีเซอรอลจากสบู่และกรดไขมันในการผลิตไบโอดีเซลประมาณ 200 ตันต่อวันจะเกิดกลีเซอรอลดิบที่เป็นผลพลอยได้จำนวนมากถึง 14-16 ตันต่อวัน กลีเซอรอลดิบที่ได้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลและไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โรงงานที่มีการผลิตไบโอดีเซลจึงจำเป็นต้องกำจัดทิ้งในฐานะที่เป็นของเสีย ดังนั้น หากมีการนำกลีเซอรอลเหล่านี้มาบำบัดให้มีความบริสุทธิ์เพียงพอจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ ทำให้กลีเซอรอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง (Jones และ Woods, 1986)

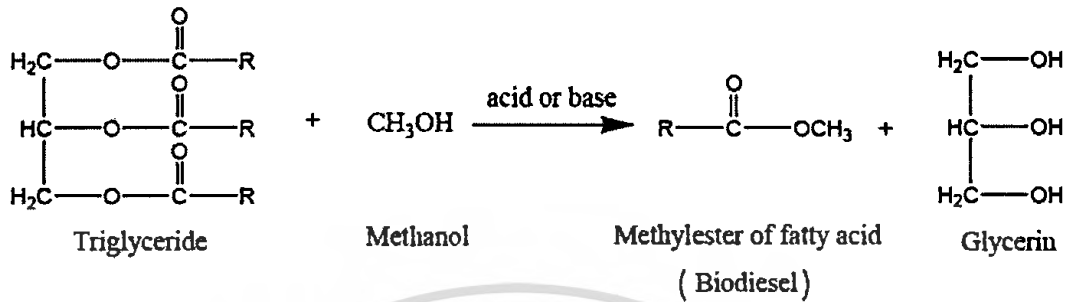
#### 2.4.1 การสังเคราะห์กลีเซอรอล

##### 2.4.1.1 กระบวนการแยกจากผลพลอยได้ออกจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล หรือจากอุตสาหกรรมน้ำมัน

ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยการสกัดกลีเซอรอลออกด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล เรียกกระบวนการนี้ว่า Transesterification โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น กรด เบส หรือเอนไซม์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพและส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้เพื่อให้ได้โมโนแอลคิลเอสเทอร์ (Monoalkyl ester) หรือเมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) ตามสมการในรูปที่ 2.7 เมื่อน้ำมันพืชถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์แล้วขนาดโมเลกุลจะลดลงเหลือ 1 ใน 3 เป็นผลทำให้ความหนืดของน้ำมันลดลงอย่างมากซึ่งมีความใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล

กลีเซอรอลหรือกลีเซอริน (Glycerin) สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติเมื่อซึมผ่านลงไปในดิน ซึ่งจะถูกแบคทีเรียบางชนิดย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว ไม่เป็นสารพิษ (Non-toxic) ไม่เป็นไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อันตรายต่อพืชและสัตว์ เมทานอลหรือเอทานอลที่เป็นส่วนเกินจากปฏิกิริยา สามารถระเหยไปในอากาศเองได้ เมื่อทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์เราสามารถนำกลีเซอรอลส่วนนี้ไปทำสบู่ทำความสะอาดต่อไปได้



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชันของน้ำมันพืช

ที่มา : <https://sites.google.com/site/takecarenaaaaa/khwam-pen-ma-khxng-bi-xo-disel>

(วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2562)

เนื่องด้วยกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้น้อย เนื่องจากกลีเซอรอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายอย่างและมีราคาแพงมาก อย่างไรก็ตาม กลีเซอรอลที่เราได้จากกระบวนการทำไบโอดีเซลนี้มีสารปนเปื้อนอยู่มาก ส่วนใหญ่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และแอลกอฮอล์ส่วนเกินอีกทั้งคราบอื่นๆที่ปนเปื้อนมาในน้ำมันภายหลังการทำอาหาร การจะระเหยเอาแอลกอฮอล์ออกจากกลีเซอรอลให้หมดนั้นต้องถูกนำมาต้มในที่ที่มีอากาศถ่ายเท ถ้าใช้เมทานอล ต้องต้มให้ความร้อนสูงเกินจุดเดือด (Boiling point) คือ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ถ้าใช้เอทานอล จะต้องต้มให้ความร้อนสูงเกิน 79 องศาเซลเซียส และถ้าต้องการระเหยน้ำออกให้หมดต้องต้มอย่างต่ำ 10 นาที กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์สูงๆ นั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการต่างๆ ได้ อย่างหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา นำไปใช้ในการทำสบู่หรือ แม้กระทั่งใช้ในการผลิตระเบิด ด้วยเหตุนี้จึงมีการคิดวิธีที่จะทำให้กลีเซอรอลมีความบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อเพิ่มมูลค่าของกลีเซอรอล โดยกระบวนการและวิธีที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์

## 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 และ ATCC 4259 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous cultures) เป็นระยะเวลา 70 วัน (Andrade และ คณะ, 2003) โดยใช้อาหารที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลและกลูโคส พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้

ร้อยละ 43-62 โดยน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด เมื่อใช้กลีเซอรอลคุณภาพต่ำที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้กลีเซอรอลทั่วไป

สุรศักดิ์ แป้นแก้วและคณะ (2552) ได้ศึกษากระบวนการหมักกลีเซอรอลด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Enterobacter aerogenes* ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตบิวทานอล ให้ผลดีกว่าที่อุณหภูมิห้องเล็กน้อย (30 องศาเซลเซียส) และเพื่อเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการหมักควรใช้กลีเซอรอลดิบที่แยกชั้นสารอินทรีย์หรือสิ่งเจือปนออกแล้ว เป็นสารตั้งต้น เพราะสารอินทรีย์ที่เจือปนในกลีเซอรอลดิบส่งผลต่อกระบวนการย่อยสลายกลีเซอรอลของเชื้อ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ำ เช่น เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร จะได้เปอร์เซ็นต์ Conversion สูงกว่า 80% และยังให้ผลได้เอทานอลสูงกว่า 15 กรัม ต่อ 100 กรัมของกลีเซอรอล

จากการศึกษาการเปลี่ยนกลีเซอรอลที่ได้จากไบโอดีเซลเป็น n-butanol ผ่านกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนโดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* ที่ถูกตรึงเซลล์ใน Amberlite Khanna และคณะ (2013) ทำการทดลองเพื่อปรับสภาวะการเติบโตให้เหมาะสมในอาหาร Reinforced Clostridial Media (RCM) และ Cooked Meat Media (CMM) จากอาหารทั้งสองนี้พบว่าแบคทีเรียเจริญเติบโตเร็วกว่าใน RCM ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของกลีเซอรอลดิบที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้สูงสุดของ n-butanol 8.0836 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่ 150 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตบิวทานอล ส่วนความเข้มข้นที่ให้ผลผลิตสูงสุดของเอทานอล 0.235 กรัมต่อลิตร และ 1,3-โพรเพนไดออล 0.144 กรัมต่อลิตร ด้วยกลีเซอรอลดิบคือ 5 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ในปี 2014 Gallardo และคณะศึกษาผลของความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบในการผลิตบิวทานอลและ 1,3-โพรเพนไดออล โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* DSM 525 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่มากกว่า 35 กรัมต่อลิตร มีผลได้ของบิวทานอลมากกว่า 1,3-โพรเพนไดออล และการเติมบิวทิเรตในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ความเข้มข้นของบิวทานอลสูงขึ้น 45% และการผลิตของ 1,3-โพรเพนไดออลลดลง ช่วยลดระยะเวลาในการหมัก ส่วนการเติมอะซิเตทช่วยเพิ่มความเข้มข้นของบิวทานอลแต่กระบวนการหมักนานขึ้น แม้ว่าการใช้กลีเซอรอลจะไม่สามารถเพิ่มได้มากกว่า 32 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยอื่นนอกจากการยับยั้งบิวทานอลและมีข้อจำกัดของสารอาหารที่มีผลต่อการนำกลีเซอรอลไปใช้ของแบคทีเรีย

Sarchan และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาการหมักกลีเซอรอลดิบในถังหมักขนาด 7 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้เชื้อ *Clostridium pasteurianum* DSM 525 จากผลการทดลองนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้ผลผลิตบิวทานอลมากที่สุดคือใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 50 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่ pH 6.8 และ ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยได้ผลผลิตบิวทานอล 34% ของโมลบิวทานอลต่อโมลกลีเซอรอล ดังนั้นการศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลดิบสามารถเป็นวัตถุดิบที่มีแนวโน้มที่ดีสำหรับการผลิตบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* sp. สายพันธุ์ CT7 (Xin และคณะ, 2017) ซึ่งมีความสามารถในการใช้กลีเซอรอลได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยอัตราส่วนที่มีบิวทานอลสูง ซึ่งมีสถานะในการเพาะเลี้ยงหลายปัจจัย องค์ประกอบอาหารเช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารอาหารรองและ pH แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอล ในการศึกษาที่ใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น และหมักแบบกะ ได้ผลผลิตบิวทานอล 16.6 กรัมต่อลิตรและผลได้ 0.43 กรัมต่อกรัม นอกจากนี้ CT7 ยังสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลดิบเป็นบิวทานอล ได้ 11.8 กรัมต่อลิตรโดยตรงโดยไม่ต้องทำการปรับสภาพก่อน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

#### 3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ทำการคัดแยกไว้แล้ว 9 สายพันธุ์ ได้แก่ R11 R16 B16 B21 C11 C13 C20 C21 และ C22 (ก้องกิตติกร และปพิษฐา, 2560) เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM, Difco™) ใช้เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ และใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่ได้ทำการคัดแยกไว้แล้ว 9 สายพันธุ์ ได้แก่ R11 R16 B16 B21 C11 C13 C20 C21 และ C22 เพื่อให้มีการเจริญเติบโต (ภาคผนวก ก)

อาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งดัดแปลงมาจากอาหาร TYA ตามรายงานของ Ogata และคณะ (1973) ใช้เพื่อทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) ของเชื้อแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

อาหารแข็ง Blood agar base ใช้ในการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของเชื้อตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ก)

#### 3.1.3 กลีเซอรอลดิบ

กลีเซอรอลดิบที่นำมาทดลองได้รับมาจาก บริษัท บางจากไบโอฟูเอล ตั้งอยู่ที่ 28 หมู่ 9 ตำบลบางกระสัน อำเภอบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย จากนั้นนำมาตรวจสอบความเข้มข้น โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) พบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 1212.682 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก)

#### 3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

ตู้อบเชื้อ (Incubator)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)

หม้อนึ่งฆ่าเชื้ออัตโนมัติ (Autoclave)

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

ชุดกรองสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โถดูดความชื้น (Desiccator)	เตาอบไมโครเวฟ
แอนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar)	ออโต้ปิเปตต์ (Autopipettes)
ตัวกรองสารขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร	แผ่นดูดออกซิเจน ยี่ห้อ BD GasPak™ EZ
ปิเปตต์แก้ว	ขวด Vial
พลาสติกขนาด 250 และ 500 ml	คิวเวทท์พลาสติก
ขวดเก็บตัวอย่าง	จานเพาะเชื้อพลาสติก
บีกเกอร์	หลอดปั่นเหวี่ยง
จุกสำลี	หลอดทดลอง
ตะเกียงแอลกอฮอล์	ลวดเขี่ยเชื้อ
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	แท่งแก้วคนสาร
ปิเปตต์ทึบ	จุกยางดูดสาร
กระบอกตวง	ขวด Duran
กระดาษกรองสาร Cellulose Acetate ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร	
คอลัมน์ HPLC ; Aminex HPX-87H และ Fermentation Monitoring	
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	

### 3.1.5 สารเคมี

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Glycerol)	กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)
กรดไฮโดรคลอริก (HCL)	กรดซิตริก (Citric acid)
อะซิโตน (Acetone)	บิวทานอล (Butanol)
เอทานอล (Ethanol)	น้ำมันพาราฟิน (Paraffin oil)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	ทริปโตน (Tryptone)
ผงวุ้น (Agar)	สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)
เปปโตน (Peptone)	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
เลือดแกะ (Sheep blood)	แอมโมเนียมอะซิเตต (Ammonium acetate)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )	สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
$MgSO_4 \cdot 4H_2O$	$FeSO_4 \cdot 5H_2O$
Malachite green	Cysteine hydrochloride
Crystal Violet	Gram's iodine
Safranin O	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเลี้ยงเชื้อตัวอย่าง

นำเชื้อตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) โดยทำการเขี่ยเชื้อจากหัวเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ลงในอาหารเหลว Reinforced Clostridia Medium (RCM) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปต Paraffin oil ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปิดทับอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการถ่ายเชื้อจำนวน 2 ครั้ง เพื่อคัดแยกเชื้อและป้องกันการปนเปื้อนจากการเพาะเลี้ยง

### 3.2.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อตัวอย่าง

นำเชื้อตัวอย่างที่ผ่านการบ่มแบบสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 5 วัน ในอาหารเหลว Reinforced Clostridia Medium (RCM) ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะของเชื้อด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram's stain) และการย้อมเอนโดสปอร์ (Endospore stain) จากนั้นส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะของเซลล์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการศึกษาเป็นแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างเป็นท่อน (Rod shaped cells) และสามารถสร้างสปอร์ได้ สามารถมองเห็นสปอร์ได้ชัดเจนจากการย้อมเอนโดสปอร์ ซึ่งสปอร์ของเซลล์จะติดสีเขียว

### 3.2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง

นำเชื้อตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์มาทำการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยการนำเชื้อไปทำการ Streak plate ลงบนอาหารแข็ง Blood agar base (Atlas, 2010) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาตรวจการย่อยเม็ดเลือดแดง จากลักษณะรอย Streak ที่เกิดขึ้น

Alpha Hemolysis คือ มีการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินบางส่วน สังเกตสีเลือดโดยรอบรอย streak เปลี่ยนเป็นสีเขียวเทา

Beta Hemolysis คือ สังเกตเห็นรอยสีขาวเกิดขึ้นตามรอย streak (Clear zone) นั่นคือ เชื้อตัวอย่างเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง

Gamma Hemolysis คือ สังเกตเห็นเชื้อตัวอย่างเจริญเติบโตขึ้นตามรอย streak โดยไม่เกิดรอยสีขาว (Clear zone) ขึ้นบริเวณรอบ ๆ รอย Streak

### 3.2.4 การทดสอบความสามารถในผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

นำเชื้อตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดแดงแล้ว ทั้ง 9 สายพันธุ์ มาทำการถ่ายลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามใช้ในงานอื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ เมื่อครบเวลา 5 วัน ให้นำตัวอย่างทั้ง 9 สายพันธุ์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

### 3.2.5 การหาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

หลังจากทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เรียบร้อยแล้ว ให้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีปริมาณการผลิตบิวทานอลสูงสุด 2 สายพันธุ์ มาศึกษาหาช่วงเวลาที่เชื้อสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด จากนั้นนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยง โดยนำเชื้อที่ถูกเก็บรักษาไว้มาเลี้ยงในอาหารเหลว RCM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อ (Inoculum) ต่อมานำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว T6 ที่มีความเข้มข้นกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 350 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างทั้ง 2 สายพันธุ์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตามช่วงเวลาที่สนใจ ได้แก่ 0 12 24 36 48 60 72 96 120 ชั่วโมง โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลต่อไป

### 3.2.6 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ และกลีเซอรอลดิบ

เมื่อทราบเวลาที่ให้ปริมาณการผลิตบิวทานอลสูงสุดแล้วให้ทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดในเวลาที่เหมาะสม 1 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยง โดยนำเชื้อที่ถูกเก็บรักษาไว้ถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว RCM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง จากนั้นนำหัวเชื้อถ่ายลงในอาหารเหลว T6 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นกลีเซอรอลบริสุทธิ์ 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบ 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน แล้วทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่มีปริมาณบิวทานอลสูงที่สุด โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

#### 3.3.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ทั้ง 9 สายพันธุ์ โดยนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ทั้งหมดโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography, HPLC ) โดยส่วนใสต้องนำมาผ่านการกรองด้วยตัวกรองสารขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาผสมกับกรดซิตริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อกรดซิตริก เท่ากับ 1 ต่อ 1 เมื่อผสมเสร็จแล้วให้จัดเก็บใส่ไว้ในขวด Vial เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้ Fermentation Monitoring Column ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ในกรณีศึกษาการปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล และใช้ Aminex HPX-87H Column ที่มีความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร ในกรณีศึกษาเวลาและความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิคอลัมน์ (Column oven) 37 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่มีอัตราการไหล (Flow rate) 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ (Run time) 30 นาที วิเคราะห์ผลด้วย Refractive index detector โดยวัดการหักเหแสงของสาร จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่มี Retention time เดียวกัน มาทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้ทำการวิเคราะห์ไว้ก่อนหน้านี้อย่างนี้แล้ว ดังภาคผนวก ข

#### 3.3.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองแต่ละชุดตัวอย่างทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษา และเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ได้จากการทดลอง โดยคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistic เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยตาราง ANOVA โดยใช้การทดสอบแบบ Duncan's ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4


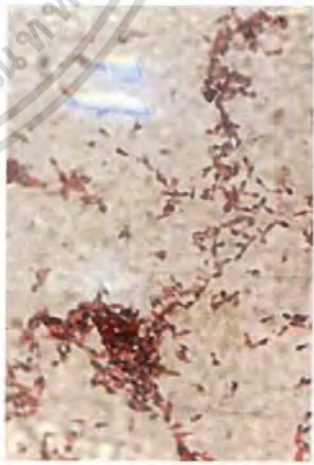
### ผลงานวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 การยืนยันเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากกลีเซอรอลได้

##### 4.1.1 รูปร่างและลักษณะของเชื้อที่นำมาทดลอง

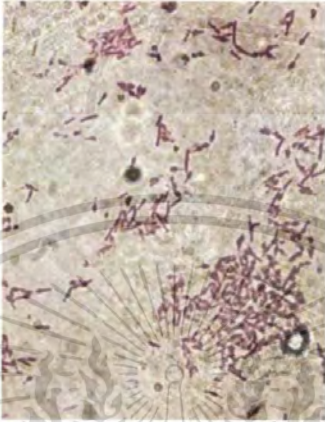
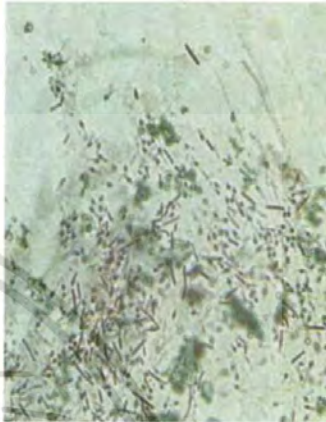

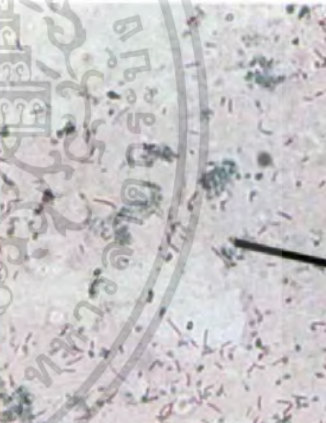

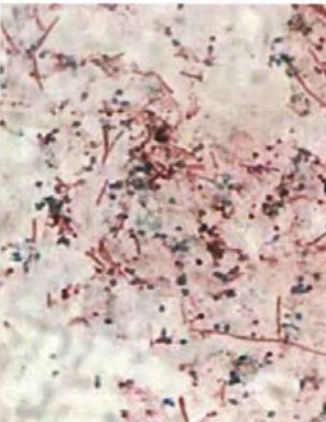
เชื้อแบคทีเรียที่นำมาคัดเลือกทั้ง 9 สายพันธุ์ ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM และบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน มาแล้ว นำมาทำการย้อมแกรมและย้อมสปอร์ เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ โดยส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่า รูปร่างและลักษณะของเชื้อที่สังเกตเห็นมีลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ย้อมติดสีม่วงแกรมบวก และเมื่อนำมาย้อมสปอร์เห็นได้ว่าลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าสปอร์ติดสีเขียวและมีลักษณะคล้ายรูปไข่ ดังในตาราง 4.1 ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ *Clostridium* sp. ตามการรายงาน Bergey's manual of Systematic volume 3 (2009)

ตารางที่ 4.1 รูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์
R11		




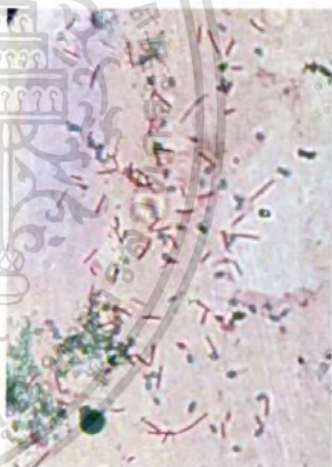
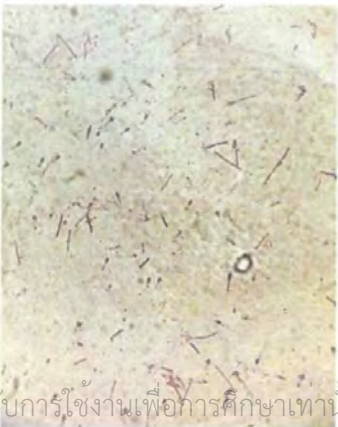
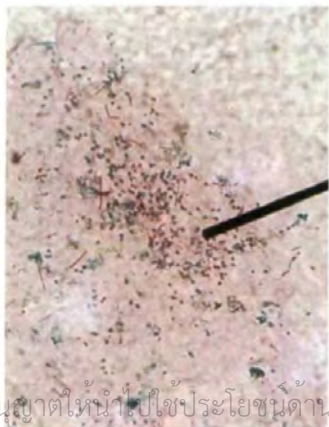
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์
R16		
B16		
B21		

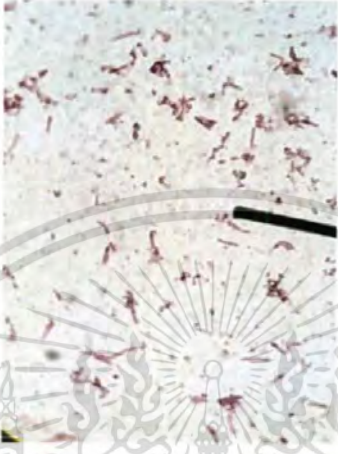
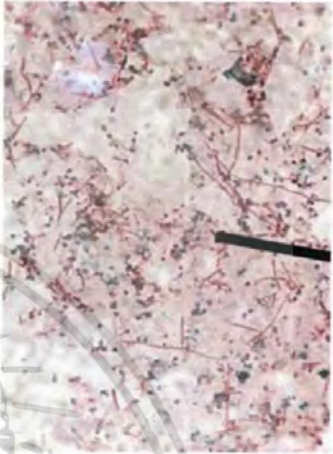

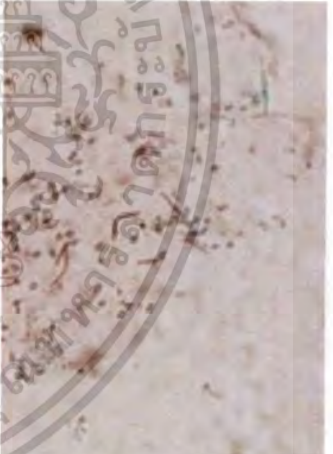
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามแก้ไขตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์
C11		
C13		
C20		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	การย้อมแกรม	การย้อมสปอร์
C21		
C22		


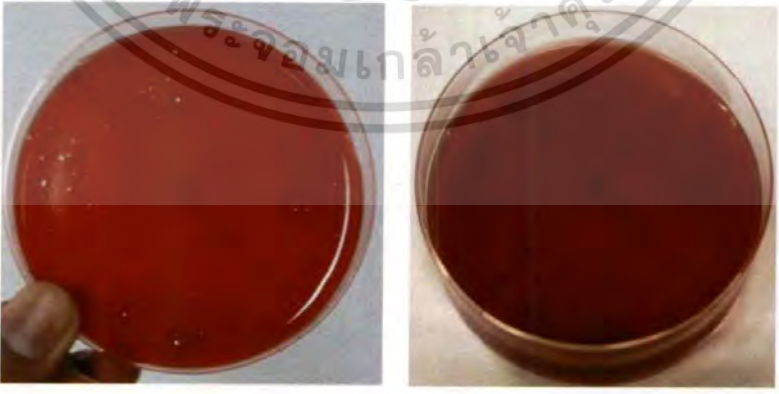
#### 4.1.2 ผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง เป็นการทดสอบเพื่อดูความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรียที่นำมายืนยันทั้ง 9 สายพันธุ์ ซึ่งผ่านการขีดเชื้อ (Streak) ลงบนอาหารแข็ง Blood agar base ที่เติมเลือดและลงไปเป็นส่วนประกอบของอาหาร แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากการสังเกตพบว่า บริเวณรอบ ๆ รอยขีดเชื้อ (Streak) ของเชื้อทั้ง 9 สายพันธุ์ ไม่ปรากฏรอยลักษณะสีขาว (Clear zone) และลักษณะรอยสีเขียวเทาเกิดขึ้น

นั่นคือ ไม่เกิด Beta hemolysis และ Alpha hemolysis ซึ่งลักษณะที่ปรากฏบนอาหารแข็งและรอบ ๆ รอยขีดเชื้อ (Streak) สีของอาหารมีลักษณะเข้มข้นเล็กน้อยและเห็นการเจริญเติบโตของเชื้อไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

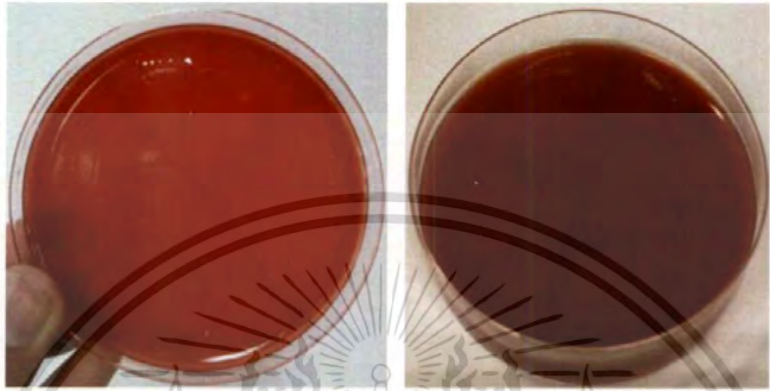

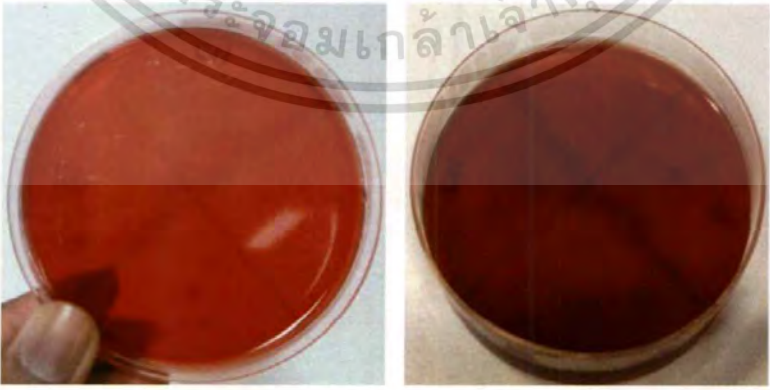
แสดงว่า เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดลองเป็นชนิด Gamma hemolysis (ดังปรากฏในตาราง 4.2) ซึ่งไม่เป็นเชื้อก่อโรคทำให้การปฏิบัติงานและตัวผู้ทดลองมีความปลอดภัย ตามการรายงานของ Rassolie และคณะ (2019) ได้รายงาน bahwa เชื้อแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยนำเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ต่างๆ มาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมเลือดเป็นส่วนประกอบเพื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย แล้วนำไปเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่ามีเชื้อ *Clostridium* sp. อยู่ 33% จากเชื้อทั้งหมดที่นำมาทดลอง ซึ่งสามารถบอกได้ว่าเชื้อ *Clostridium* sp. สามารถเติบโตได้ในอาหาร Blood agar base

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง Blood agar base โดยวิธี Streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	ลักษณะที่ปรากฏ	ผลการย่อย
R11		-
R16		-

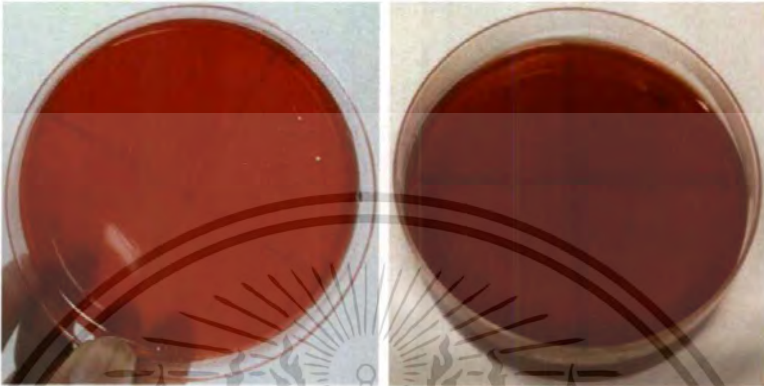

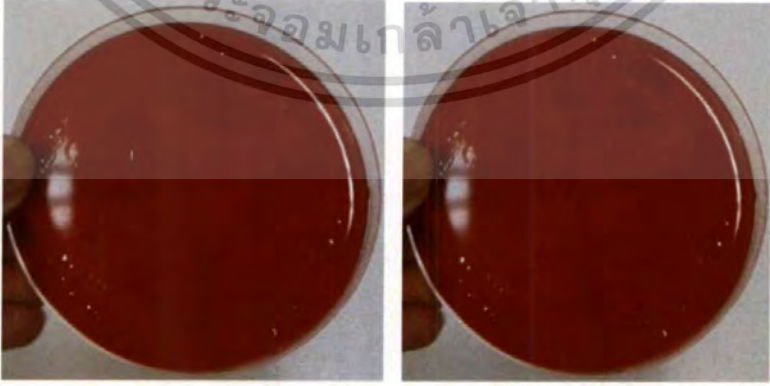
หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (เชื้อก่อโรค) ~  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 เครื่องหมาย - หมายถึง แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (ไม่ก่อโรค)  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง Blood agar base โดยวิธี Streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	ลักษณะที่ปรากฏ	ผลการย่อย
B16		-
B21		-
C11		-

เอกสารนี้เผยแพร่โดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ + หมายถึง แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (เชื้อก่อโรค) คำ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น หรือหากมีความผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูง (ไม่ก่อโรค)

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง Blood agar base โดยวิธี Streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	ลักษณะที่ปรากฏ	ผลการย่อย
C13		-
C20		-
C21		-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (เชื้อก่อโรค)

เครื่องหมาย - หมายถึง แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (ไม่ก่อโรค)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง Blood agar base โดยวิธี Streak plate บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

สายพันธุ์	ลักษณะที่ปรากฏ	ผลการย่อย
C22		-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึง แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (เชื้อก่อโรค)  
เครื่องหมาย - หมายถึง แบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (ไม่ก่อโรค)

#### 4.1.3 การคัดเลือกเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลผลิตบิวทานอลได้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อที่สามารถผลิตบิวทานอลได้มีอยู่ 6 สายพันธุ์และอีก 3 สายพันธุ์ตรวจไม่พบการผลิตบิวทานอล เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS statistic เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าเชื้อที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด ได้แก่ C11 และ C13 ซึ่งมีความเข้มข้นบิวทานอลอยู่ที่  $0.73 \pm 0.64$  และ  $0.75 \pm 0.65$  ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ C11 ตรวจไม่พบการผลิตอะซิโตน และสามารถผลิตเอทานอล  $15.85 \pm 2.42$  กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ C13 ไม่พบการผลิตอะซิโตนเช่นกัน และสามารถผลิตเอทานอล  $14.36 \pm 2.50$  กรัมต่อลิตร ตามตาราง 4.3

จากการศึกษาของ Biebl (2001) พบว่า *Clostridium pasteurianum* สามารถผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลได้ โดยรายงานที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงถึง 17 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ตามรายงานของ สุรศักดิ์ และคณะ (2552) กระบวนการหมักกลีเซอรอลด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เอกสาร *Enterobacter aerogenes* แบบไร้ออกซิเจนเพื่อผลิตบิวทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ผลค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีกว่ากระบวนการที่ดำเนินการที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เล็กน้อย และเมื่อดำเนินการที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ำจะสามารถเพิ่มปริมาณการได้รับบิวทานอล และเอทานอลได้

ตารางที่ 4.3 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือก ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของตัวทำละลายในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ( กรัมต่อลิตร )			
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ABE ทั้งหมด
R11	N/A	N/A	20.90 <sup>b</sup> ±2.95	20.90 <sup>b</sup> ±2.95
R16	2.03 <sup>a</sup> ±1.80	0.25 <sup>a</sup> ±0.43	17.91 <sup>b</sup> ±2.16	20.19 <sup>b</sup> ±4.39
B16	0.63 <sup>ab</sup> ±1.90	N/A	18.95 <sup>b</sup> ±3.96	19.58 <sup>b</sup> ±5.86
B21	0.75 <sup>ab</sup> ±1.30	0.19 <sup>a</sup> ±0.33	15.64 <sup>b</sup> ±1.91	16.58 <sup>b</sup> ±3.54
C11	N/A	0.73 <sup>a</sup> ±0.64	15.85 <sup>b</sup> ±2.42	16.58 <sup>b</sup> ±3.06
C13	N/A	0.75 <sup>a</sup> ±0.65	14.36 <sup>b</sup> ±2.50	15.11 <sup>b</sup> ±3.15
C20	N/A	0.28 <sup>a</sup> ±0.49	19.65 <sup>b</sup> ±4.91	19.93 <sup>b</sup> ±5.40
C21	0.76 <sup>ab</sup> ±1.30	0.13 <sup>a</sup> ±0.23	19.04 <sup>b</sup> ±3.92	19.93 <sup>b</sup> ±5.45
C22	N/A	N/A	30.52 <sup>a</sup> ±10.97	30.52 <sup>a</sup> ±10.97

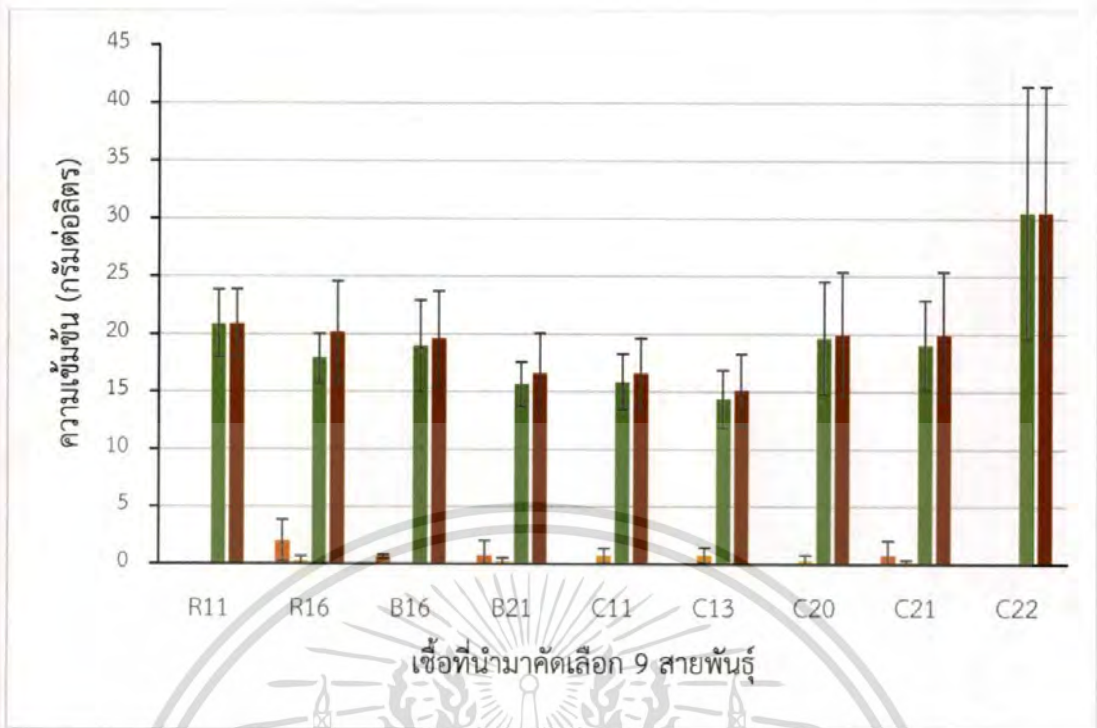
หมายเหตุ : รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือ ไม่สามารถวัดได้

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสัณฐานเดียวกันหมายถึงค่าทางสถิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ABE หมายถึง อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือก ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (■ อะซิโตน ■ บิวทานอล ■ เอทานอล ■ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลทั้งหมด)

#### 4.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

เมื่อนำเชื้อ 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด นั่นคือ C11 และ C13 มาเริ่มทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร RCM เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 72 จึงเริ่มเก็บทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการผลิต ABE ด้วยเครื่อง HPLC แล้วเมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS statistics เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 พบว่า เชื้อ C11 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีความเข้มข้นสูงถึง  $1.73 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ 4.4 และมีแนวโน้มการผลิตบิวทานอลที่ลดลงเรื่อย ๆ ส่วนเชื้อ C13 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีความเข้มข้น  $2.66 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร ตามตารางที่ 4.5 และมีแนวโน้มการผลิตบิวทานอลลดลงเรื่อย ๆ เช่นเดียวกันกับ C11 ซึ่งหากดูจากปริมาณบิวทานอลที่ได้จึงทำการเลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย C13 เพื่อนำไปทำการศึกษาต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษา Andrade และคณะ (2003) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 และ ATCC 4259 ด้วยการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous cultures) เป็นระยะเวลา 70 วัน ซึ่งใช้อาหารที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอลและกลูโคส พบว่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ 14 14.6 14.9 และ 16 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 7.6 4.2 6.6 และ 5.4 กรัมต่อลิตร โดยได้ใช้กลีเซอรอลคุณภาพต่ำที่ได้จากการผลิตไบโอดีเซลมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้กลีเซอรอลทั่วไป

ตารางที่ 4.4 ปริมาณความเข้มข้นตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C11 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาที่สนใจทุก 12 ชั่วโมง

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)			
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ABE ทั้งหมด
0	18.20 <sup>a</sup> ±0.1	N/A	N/A	18.20 <sup>d</sup> ±0.10
12	18.90 <sup>bcde</sup> ±0.73	N/A	N/A	18.90 <sup>d</sup> ±0.73
24	20.10 <sup>a</sup> ±0.55	0.50 <sup>c</sup> ±0.45	1.59 <sup>d</sup> ±0.1	22.19 <sup>bc</sup> ±1.10
36	19.25 <sup>abcd</sup> ±0.33	1.73 <sup>a</sup> ±0.15	2.34 <sup>b</sup> ±0.17	23.32 <sup>ab</sup> ±0.65
48	18.33 <sup>de</sup> ±0.89	1.49 <sup>ab</sup> ±0.18	2.09 <sup>c</sup> ±1.89	21.91 <sup>b</sup> ±2.96
60	18.28 <sup>de</sup> ±0.26	1.42 <sup>ab</sup> ±0.06	2.15 <sup>bc</sup> ±0.09	21.85 <sup>b</sup> ±0.41
72	18.51 <sup>cde</sup> ±0.68	1.45 <sup>ab</sup> ±0.15	2.12 <sup>bc</sup> ±1.73	22.08 <sup>bc</sup> ±2.56
96	19.64 <sup>ab</sup> ±0.41	1.63 <sup>ab</sup> ±0.04	2.57 <sup>a</sup> ±0.04	23.84 <sup>a</sup> ±0.49
120	19.33 <sup>abc</sup> ±0.22	1.35 <sup>b</sup> ±0.05	2.28 <sup>bc</sup> ±0.16	22.96 <sup>abc</sup> ±0.43

หมายเหตุ : รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือ ไม่สามารถวัดได้

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงค่าทางสถิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ABE หมายถึง อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 เชื้อแบคทีเรีย C11 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณความเข้มข้นตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C13 ในอาหารเหลว T6 ที่เติม กลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่สนใจทุก 12 ชั่วโมง

เวลาที่เก็บ ตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของตัวทำละลายในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)			
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ABE ทั้งหมด
0	0.06 <sup>e</sup> ± 0.11	N/A	N/A	0.06 <sup>f</sup> ± 0.11
12	0.10 <sup>e</sup> ± 0.18	N/A	N/A	0.10 <sup>f</sup> ± 0.18
24	1.28 <sup>b</sup> ± 0.12	0.12 <sup>e</sup> ± 0.02	0.27 <sup>de</sup> ± 0.03	1.67 <sup>e</sup> ± 0.17
36	2.20 <sup>a</sup> ± 0.10	0.71 <sup>d</sup> ± 0.15	0.51 <sup>d</sup> ± 0.12	3.41 <sup>d</sup> ± 0.37
48	1.31 <sup>b</sup> ± 0.02	1.52 <sup>c</sup> ± 0.03	0.91 <sup>c</sup> ± 0.00	3.74 <sup>cd</sup> ± 0.05
60	0.87 <sup>c</sup> ± 0.07	2.11 <sup>b</sup> ± 0.16	1.34 <sup>b</sup> ± 0.15	4.32 <sup>abc</sup> ± 0.38
72	0.52 <sup>d</sup> ± 0.03	2.66 <sup>a</sup> ± 0.17	1.59 <sup>ab</sup> ± 0.37	4.77 <sup>a</sup> ± 0.57
96	0.47 <sup>d</sup> ± 0.12	2.36 <sup>ab</sup> ± 0.22	1.73 <sup>a</sup> ± 0.12	4.56 <sup>ab</sup> ± 0.46
120	0.37 <sup>d</sup> ± 0.14	2.10 <sup>b</sup> ± 0.39	1.50 <sup>ab</sup> ± 0.37	3.97 <sup>bcd</sup> ± 0.90

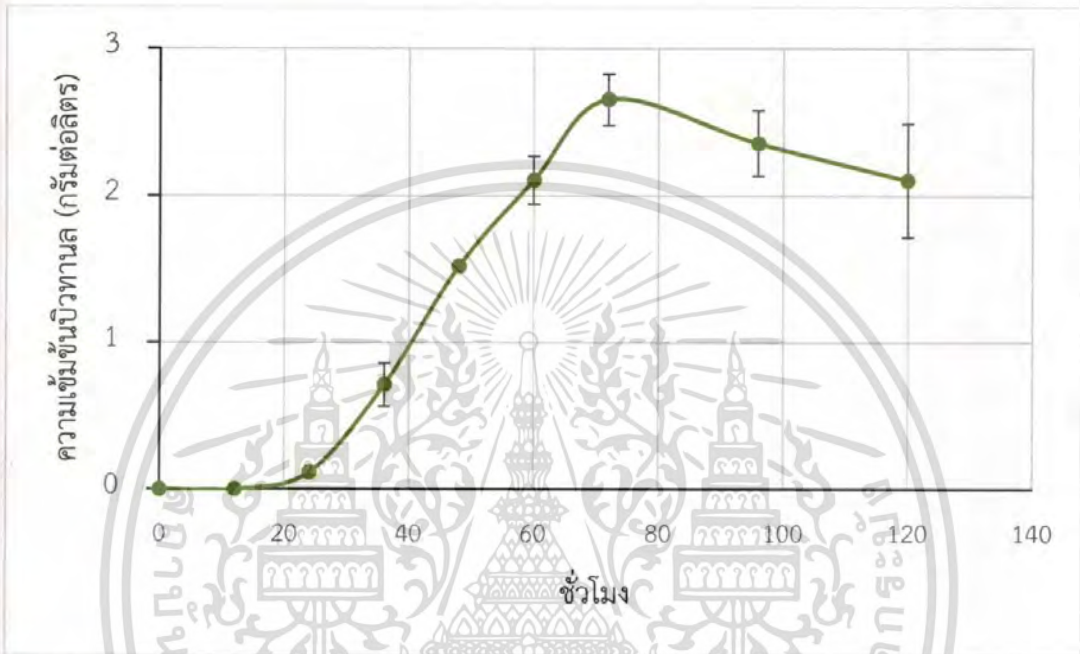
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือ ไม่สามารถวัดได้

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงค่าทางสถิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ABE หมายถึง อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล



รูปที่ 4.3 การผลิตบิวทานอลของเชื้อแบคทีเรีย C13 ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

#### 4.3 การหาความเข้มข้นกลีเซอรอลที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

นำเชื้อแบคทีเรีย C13 ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด มาทำการเริ่มเลี้ยงใหม่ในอาหารเหลว RCM เป็นเวลา 3 วันและนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว T6 ที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นแบ่งเป็นอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร และ อาหารเหลว T6 ที่เติม กลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC แล้วเมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS statistics เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 พบว่า C13 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดที่

กลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ผลิตบิวทานอลสูงถึง  $3.26 \pm 0.30$  กรัมต่อลิตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ชนดานการค้า รองลงมาคือ อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไม่วารกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอลได้สูงถึง  $2.98 \pm 0.05$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ส่วนในอาหารเหลว T6 ที่เติม กลีเซอรอลดิบในความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดถึง  $2.78 \pm 0.23$  รองลงมาคือ ในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต บิวทานอลได้  $2.70 \pm 0.08$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งอาหาร T6 ที่เติม กลีเซอรอลบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้นบิวทานอลมากกว่ากลีเซอรอลดิบ อาจเนื่องมาจาก ความบริสุทธิ์ ของกลีเซอรอลที่มากกว่าจึงทำให้เชื้อแบคทีเรีย C13 สามารถนำไปใช้ได้ดีกว่า จากการวิจัยของ Gallardo และคณะ (2014) ได้กล่าวไว้ว่า สิ่งสกปรกที่มีอยู่ในสารตั้งต้นหรือความเข้มข้นของ กลีเซอรอลเองสามารถส่งผลกระทบต่อกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งในงานวิจัย ของ Gallardo และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบต่อการผลิต บิวทานอลและ 1,3-โพรเพนไดออล (1,3-PDO) โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium pasteurianum* DSM 525 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาลงของการเสริมอะซิเตตและบิวทิเรตในอาหารเลี้ยงเชื้อผลการทดลอง แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของความเข้มข้นกลีเซอรอลดิบต่อผลผลิตของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 4.6 การผลิตตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C13 โดยใช้อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น กลีเซอรอลบริสุทธิ์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของตัวทำละลายในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (กรัมต่อลิตร)			
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ABE ทั้งหมด
10	$0.93^a \pm 0.03$	$2.72^{ab} \pm 0.64$	$3.60^a \pm 0.58$	$7.25^a \pm 1.25$
20	$0.98^a \pm 0.12$	$2.98^{ab} \pm 0.05$	$3.30^a \pm 0.05$	$7.26^a \pm 0.22$
30	$0.56^b \pm 0.16$	$3.26^a \pm 0.30$	$2.96^a \pm 0.54$	$6.78^a \pm 1.00$
40	$0.17^c \pm 0.02$	$2.36^b \pm 0.04$	$1.68^b \pm 0.02$	$4.21^b \pm 0.08$
50	$0.24^c \pm 0.05$	$2.80^{ab} \pm 0.54$	$1.80^b \pm 0.34$	$4.84^b \pm 0.93$

หมายเหตุ : รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือ ไม่สามารถวัดได้

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงค่าทางสถิติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

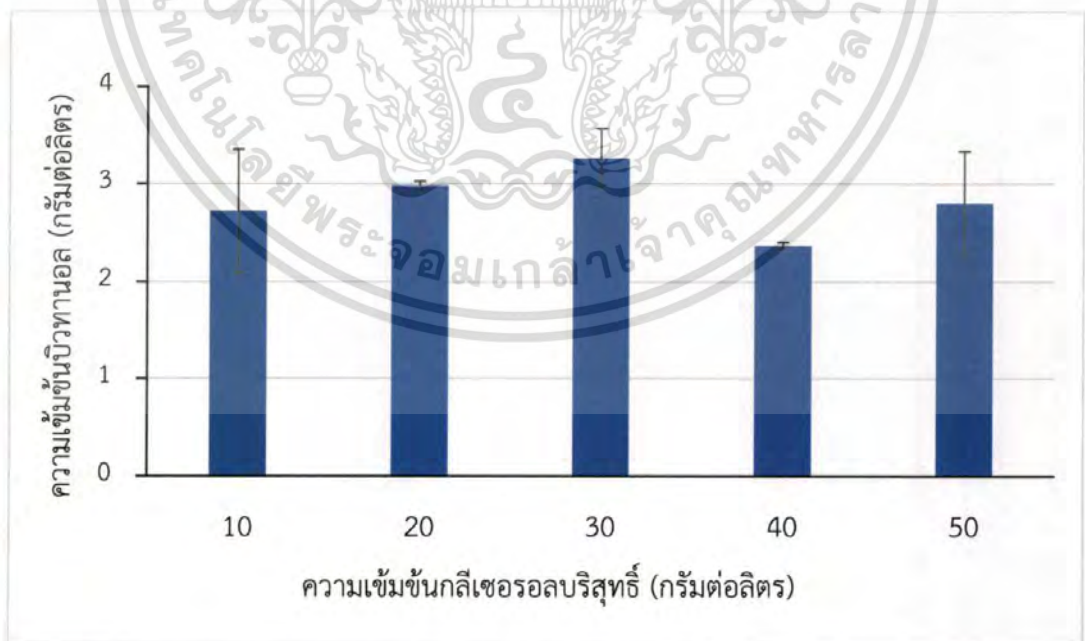
ABE หมายถึง อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การผลิตตัวทำละลายของเชื้อแบคทีเรีย C13 โดยใช้อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอล ดิบที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

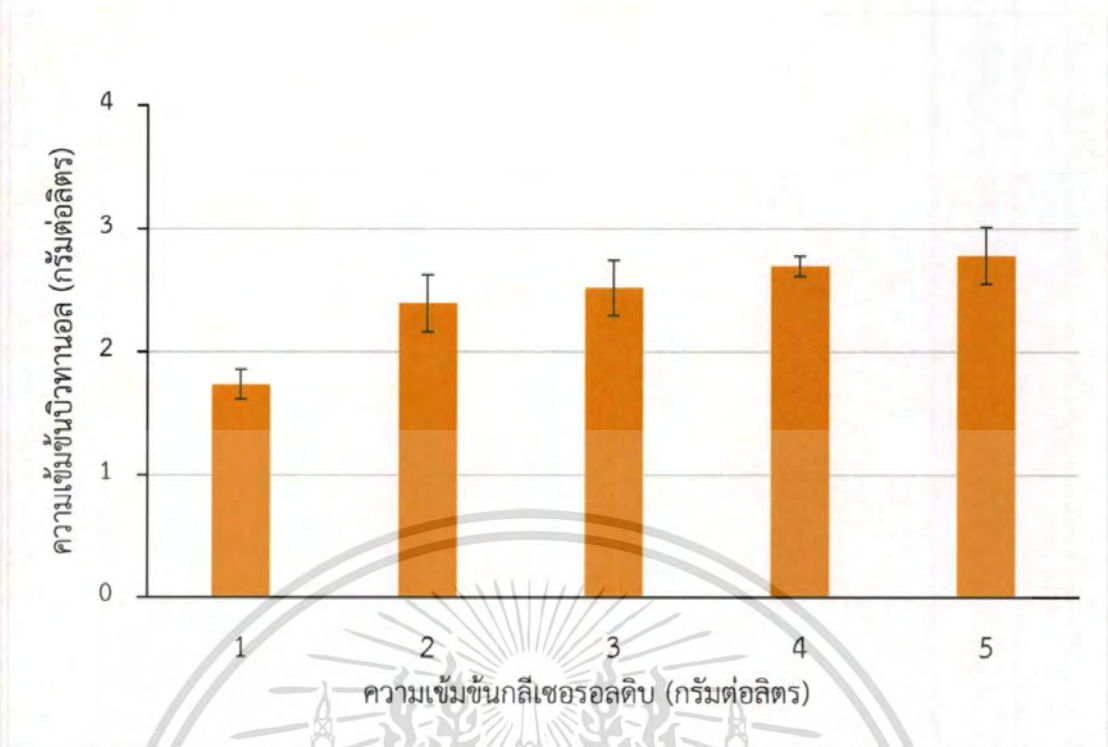
ความเข้มข้น กลีเซอรอลดิบ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของตัวทำละลายในอาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบ (กรัมต่อลิตร)			
	อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ABE ทั้งหมด
1	2.24 <sup>a</sup> ±0.12	1.74 <sup>c</sup> ±0.12	2.93 <sup>b</sup> ±0.14	6.91 <sup>b</sup> ±0.38
2	2.25 <sup>a</sup> ±0.22	2.40 <sup>b</sup> ±0.23	3.89 <sup>a</sup> ±0.51	8.54 <sup>a</sup> ±0.96
3	2.14 <sup>a</sup> ±0.18	2.52 <sup>ab</sup> ±0.23	3.74 <sup>a</sup> ±0.35	8.40 <sup>a</sup> ±0.76
4	1.85 <sup>b</sup> ±0.03	2.70 <sup>ab</sup> ±0.08	4.05 <sup>a</sup> ±0.20	8.60 <sup>a</sup> ±0.31
5	1.74 <sup>b</sup> ±0.03	2.78 <sup>a</sup> ±0.23	3.95 <sup>a</sup> ±0.36	8.47 <sup>a</sup> ±0.62

หมายเหตุ : รายงานเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
N/A คือ ไม่สามารถวัดได้  
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงค่าทางสถิติมีความแตกต่างกันอย่างมี  
นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95  
ABE หมายถึง อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นบิวทานอลที่ผลิตได้ของเชื้อ C13 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่ T6 ที่เติมกลีเซอรอล

บริสุทธิ์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ก็ตาม ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นใดได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นบิวทานอลที่ผลิตได้ของเชื้อ C13 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบในความเข้มข้นที่ต่างกัน บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ มาทำการคัดเลือกเชื้อที่สนใจ เพื่อมาใช้ในการวิจัย โดยดูจากความเข้มข้นบิวทานอล ที่เชื้อสามารถผลิตขึ้นมาได้ โดยทำการนำเชื้อ แบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM) เป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปย้อมแกรมและย้อมสปอร์เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเชื้อ พบว่าเมื่อทำการ ย้อมแกรมลักษณะเซลล์ของเชื้อที่พบได้กัล้องจุลทรรศน์ ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์ รูปท่อน (Rod shaped) และสร้างสปอร์ จากการศึกษาความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของ เชื้อแบคทีเรีย พบว่า เชื้อที่นำมาทดลองทั้ง 9 สายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง โดยดูจากรอยขีดเชื้อ (Streak) ไม่เกิดรอยขาว เกิดขึ้นบริเวณรอบๆ ซึ่งสามารถบอกได้ว่าเชื้อที่นำมา คัดเลือกทั้ง 9 สายพันธุ์ไม่ก่อโรคในกระแสดเลือด จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล บริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดนำเชื้อมาทำ การวิเคราะห์ความเข้มข้นของบิวทานอล ด้วยการใช้เครื่อง HPLC และนำค่าที่ได้มาคำนวณทางสถิติ โดยโปรแกรม SPSS statistics มาใช้ในการวิเคราะห์เชื้อทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่า มีเชื้ออยู่ 2 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงกว่าเชื้อตัวอื่นๆ ได้แก่ C11 และ C13 จึงนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สาย พันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงใหม่ด้วยเงื่อนไขเดิม แต่ในระยะเวลาที่เลี้ยงในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ทำการเก็บตัวอย่างตามชั่วโมงต่าง ๆ ได้แก่ที่เวลา 0 12 24 36 48 60 72 96 และ 120 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อ C11 และ C13 ที่ทำการเก็บชั่วโมงครบไปทำการวิเคราะห์ค่าการผลิต บิวทานอลด้วยเครื่อง HPLC อีกครั้ง พบว่า C11 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดในชั่วโมง 36 มี ความเข้มข้นบิวทานอล  $1.73 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ C13 สามารถผลิตบิวทานอลได้มาก ที่สุดในชั่วโมงที่ 72 มีความเข้มข้นบิวทานอล  $2.66 \pm 0.17$  กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเมื่อนำเชื้อ C13 มา ทำการเลี้ยงในอาหาร T6 ที่เติมความเข้มข้นกลีเซอรอลที่แตกต่างกัน พบว่าอาหาร T6 ที่เติม กลีเซอรอลบริสุทธิ์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของบิวทานอลสูงถึง  $3.26 \pm 0.3$  กรัม ต่อลิตร รองลงมา คือ อาหารเหลว T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร มีความ เข้มข้นบิวทานอลสูงถึง  $2.98 \pm 0.05$  ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้เชื่อว่าข้อมูลที่นำมาทดลองยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่สนใจให้ชัดเจน อาจนำเชื้อที่สนใจไปทำการวิเคราะห์ว่ามีเชื้อสายพันธุ์นี้มีลำดับนิวคลีโอไทป์ ใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์อื่นหรือไม่ เพื่อระบุตัวตนสายพันธุ์ของเชื้อที่สนใจให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น แล้วนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิในการเจริญเติบโตของเชื้อที่เหมาะสม เป็นต้น หรือหาข้อมูลด้านงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านนี้ต่อไป อาจทำให้อัตราการได้รับอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพิ่มมากขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- ก้องกิตติการ ถือความสัตย์ และ ปพิชญา เพ็ญอยู่. 2560. “การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่สามารถใช้กลีเซอรอลในการผลิตบิวทานอล”. โครงการานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูณัฐ วิรุณานนท์ และ วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล. 2555. “ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล”. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. 22(3) : 703-708.
- ปกรณ สุระมณี, พชณิดา ธรรมยงค์กิจ, โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ และศิริลักษณ์ พุ่มประดับ. 2553. “การสังเคราะห์กรดกลีเซอริกจากกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล”. *วารสารวิจัยพลังงาน*. 7: 66-71.
- วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกุล. 2558. *เชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพ*. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- สุรศักดิ์ แบนแก้ว, พิมพ์พรณ มายเออร์, ปยะรัตน์ บุญแสวง, สุกฤทธิรา รัตนวิไล และ ชาคริต ทองอุไร. 2552. “การศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากการหมักกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตปาล์มไบโอดีเซล”. *การประชุมเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 5 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก*. 29 เมษายน – 1 พฤษภาคม 2552. หน้า 1-5
- อังคณา สุจริต, ชุตติมณชน สติรพิพัฒน์กุล, จิรกานต์- เมืองนาโพธิ์, วรกันต์ บุรพาธนะ และเหมือนเดือน พิศาลพงศ์. 2553. “การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ”. *วิศวกรรมสาร มช.* 4: 339-347.
- Ali Rassolie, Volkan Ozenci. 2019. “Short-term culture for rapid identification of anaerobic bacteria from blood cultures. *Anaerobe*”. 57: 59-62.
- Andrade, J.C. and Vasconcelos, I. 2003. “Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum* culture stability and low-grade glycerol utilization”. *Biotechnology Letters*. 25: 121-125.
- Andersch, W., Bahl, H., Gottschalk, G. 1983. “Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*”. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 18: 327-332.
- Bryant, D.L., Blaschek, H.P. 1988. “Buffering as a means for increasing growth and butanol production by *Clostridium acetobutylicum*”. *Journal of Industrial Microbiology*. 3: 49-55.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bochman, M. 1999. "Organometallic chemistry." 808-812. in **Advanced Inorganic Chemistry**. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bowles, L.K., and Ellefson, W.L. 1985. "Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*". *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 1165-1170.
- Chen, C.K., Blaschek, H.P. 1999. "Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 170-173.
- Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Denduangbaripant J. and Chulalaksananukul, W. 2008. "Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract". *Anaerobe*. 14: 109-117.
- Dürre, P. 2007. "Biobutanol: An attractive biofuel". *Journal Biotechnology*. 1: 115 – 124.
- Ehimen, E.A., Nielsen, J.B.H., Poulsen, M. and Boelsmand, J.E. 2013. "Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae". *Renewable Energy*. 50: 476-480.
- Ennis, B.M., Qureshi, N., Maddox, L.S. 1997. "Inline toxic product removal during solvent production by continuous fermentation using immobilized *Clostridium acetobutylicum*". *Enzyme and Microbial Technology*. 9: 672-675.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2007. "Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors". *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 220 – 227.
- Xin, F., Chen, T., Jiang, Y., Lu, J., Dong, W., Zhang, W., Ma, J., Zhanga, 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.
- Garcia, A., Inotti, E.L., Fischer, J.L. 1986. "Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis". *Biotechnology and Bioengineering*. 28: 785-791.
- George, H.A., and Chen, J.S. 1983. "Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerincki* (synonym, *C. butylicum*)". *Applied Environmental Microbiology*. 46(2): 321-327.
- Hansen, A.C., Zhang, Q. and Lyne, P.W.Y. 2005. "Ethanol diesel fuel blends – a review". *Bioresource Technology*. 96: 277 -285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jones, D.T. and Woods, D.R. 1986. "Acetone-butanol fermentation revisited". *Microbiological Reviews*. 50: 484–524.
- Kaminski, W., Tomczak, E. and Gorak, A. 2011. "Biobutanol-production and purification methods". *Ecological Chemistry and Engineerings*. 18: 31 - 37.
- Kell, D. B., Peck, M. W., Rodger, G., Morris, J. G. 1981. "On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*". *Biochemical and Biophysical Research Commications*. 99: 81-88.
- Kim, N.J., Li, H., Jung, K., Chang, H.N., and Lee, P.Y. 2011. "Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11". *Bioresource Technology*. 102: 7466–7469.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J. and Jung, S.J. 2008. "Fermentative of butanol production by Clostridia". *Biotechnology and Bioengineering*. 101: 209-228.
- McCutchan, W.N. and Hickey, R.J. 1954. "The butanol acetone fermentations". *Industrial Fermentation*. 1: 374-388.
- Mitchell, W.J. 1998. "Physiology of carbohydrate to solvent conversion by Clostridia". *Advances in Microbial Physiology*. 39: 31–130.
- Niven, R.K. 2005. "Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability". *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.
- Gallardo, R., Alve, 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: 34-143.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P. 1999. "Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation". *Biotechnology Progress*. 15: 594-602.
- Qureshi, N., Meagher, M.M., Huang, J., Hutkins, R.W. 2001. "Acetone-butanol-ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite-silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*". *Journal of Membrane Science*. 187: 93-102.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือทรัพย์สินทางปัญญาเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Qureshi, N., Maddox, L.S. 2005. "Reduction in butanol inhibition by perstraction: utilization of concentrated lactose/whey permeate by *Clostridium acetobutylicum* to enhance butanol fermentation economics". *Food and Bioproducts Processing*. 83: 43-52.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Hughes, S.P., Cotta, M.A. 2008. "Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I - batch fermentation". *Biomass and Bioenergy*. 32: 168-175.
- Qureshi, N., Li, X.L., Hughes, S., Badal, C.S., Michael, A.C. 2006. "Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*". *Biotechnology Progress*. 22: 673-680.
- Robinson, G.C. 1922. "A Study of the acetone and butyl alcohol fermentation of various carbohydrates". *The Journal of Biological Chemistry*. 52: 125-155.
- 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.
- 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.
- Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G. and Sonomoto, K. 2005. "High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding". *Journal of Biotechnology*. 120(2): 197-206.
- 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.
- Woods, D.R. 1995. "The Genetic engineering of microbial solvent production". *Trends in Biotechnology*. 13: 259-264.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridial (RCM.Difco™) มีส่วนประกอบดังนี้

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
น้ำแป้ง (Soluble starch)	1.0	กรัมต่อลิตร
เดกซ์โทรส (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

ชั่งผงอาหาร RCM ปริมาณ 38 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง  $6.8 \pm 0.2$  และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ (Glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยดัดแปลงจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata และคณะ (1973) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	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 (Glycerol)	23.8	มิลลิลิตรต่อลิตร*

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

$$= 23.8 \text{ มิลลิลิตร}$$

อาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลดิบ (Glycerol) ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยดัดแปลงจากอาหาร TYA มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	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
กลีเซอรอลดิบ (Glycerol)	2.47	มิลลิลิตรต่อลิตร*

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.5 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัติโนมัติ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : \*คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$1212.682 \text{ g/L} \times V_1 = 3 \text{ g/L} \times 1000 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2.47 \text{ มิลลิลิตร}$$

อาหารทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง (Blood agar base) (Atlas, 2010) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ผงวุ้น (Agar)	15.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปป्टอน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
เลือดแกะ (Sheep blood)	50.0	มิลลิลิตร

ซึ่งส่วนประกอบของอาหาร ยกเว้นเลือดแกะ ละลายในน้ำ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง  $7.3 \pm 0.2$  นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส จึงเติมเลือดแกะลงไป ผสม  
ไม่ว่าให้เข้ากันก่อนเทลงแล้วค่อยให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

#### การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

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

คำนวณความเข้มข้นบิวทานอล ( $C_{\text{Butanol}}$ ) จากสูตร

$$\begin{aligned}C_{\text{Butanol}} &= (10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}) / \text{มวลโมเลกุล} \\ &= (10 \times 0.81 \text{ g/ml} \times 99.4 \%) / (74.12 \text{ g/mol}) \\ &= 10.86 \text{ โมลต่อลิตร}\end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายบิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$\begin{aligned}10.86 \text{ mol/L} \times V_1 &= 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml} \\ V_1 &= 9.2 \text{ มิลลิลิตร}\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 10.86 \text{ mol/L} \times V_1 &= 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml} \\ V_1 &= 2 \text{ มิลลิลิตร}\end{aligned}$$

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

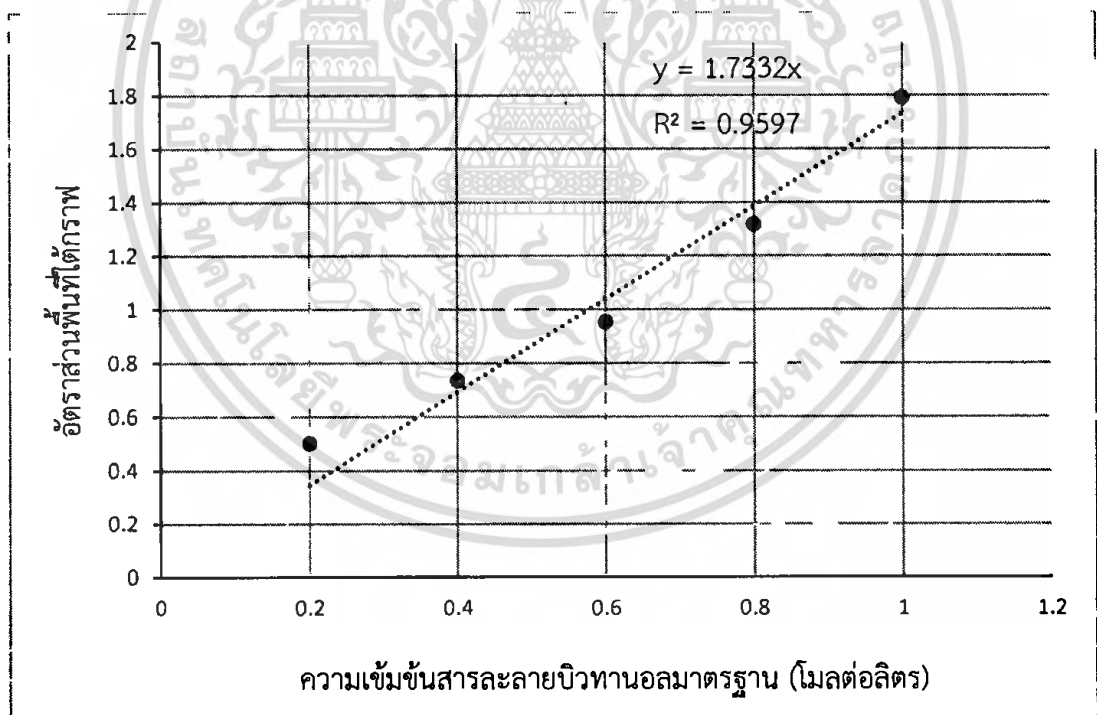
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบิวทานอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H Colum ที่มีความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร และทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลาย บิวทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ บิวทานอล	พื้นที่ใต้กราฟ กรดซिटริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล ต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก
0.2	1404450	2793709	0.502719
0.4	2455421	3342544	0.734596
0.6	410354	430081	0.954132
0.8	3583963	2718740	1.318244
1	4395368	2453264	1.791641



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟบิวทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

เอทานอลความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 46.08 กรัมต่อโมล และ ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นเอทานอล ( $C_{\text{Ethanol}}$ ) 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

$$\begin{aligned}\text{คำนวณจากสูตร } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 17.04 \text{ mol/L} \times V_1 &= 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml} \\ V_1 &= 5.78 \text{ มิลลิลิตร}\end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

$$\begin{aligned}\text{คำนวณจากสูตร } C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 1 \text{ mol/L} \times V_1 &= 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml} \\ V_1 &= 2 \text{ มิลลิลิตร}\end{aligned}$$

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

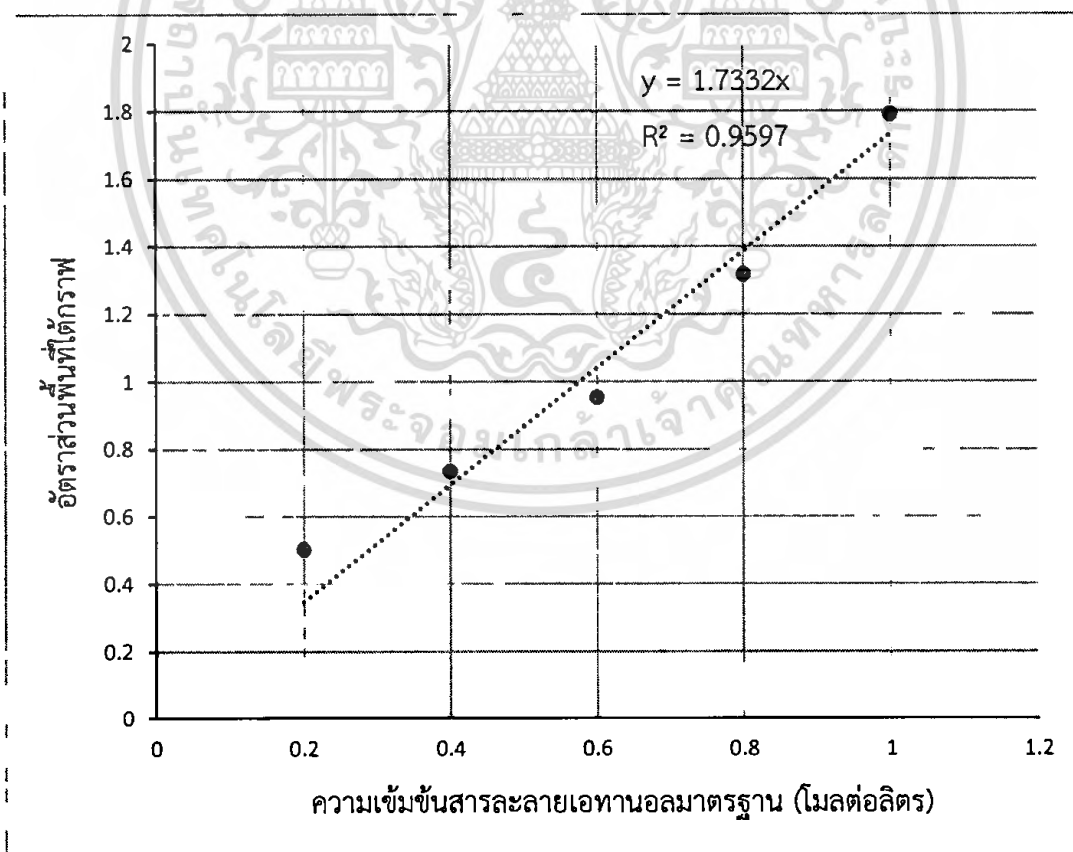
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H Colum ที่มีความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร และทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล	พื้นที่ใต้กราฟกรดซิดริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิดริก
0.2	909757	2913162	0.312292
0.4	1368787	2218136	0.617089
0.6	2099606	2153794	0.974841
0.8	3477538	2628774	1.322874
1	3854759	2055968	1.874912



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบแจ้งประโยชน์ในการค้าไม่ว่าในรูปแบบใดก็ตาม ย่อมถือว่ามีผิดกฎหมายและต้องรับผิดชอบเอง ซึ่งเอกสารนี้ทั้งที่มีการนำไปใช้

### การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

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

คำนวณความเข้มข้นอะซิโตน ( $C_{\text{Acetone}}$ ) 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  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$13.57 \text{ mol/L} \times V_1 = 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml}$$
$$V_1 = 7.37 \text{ มิลลิลิตร}$$

การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$1 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

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

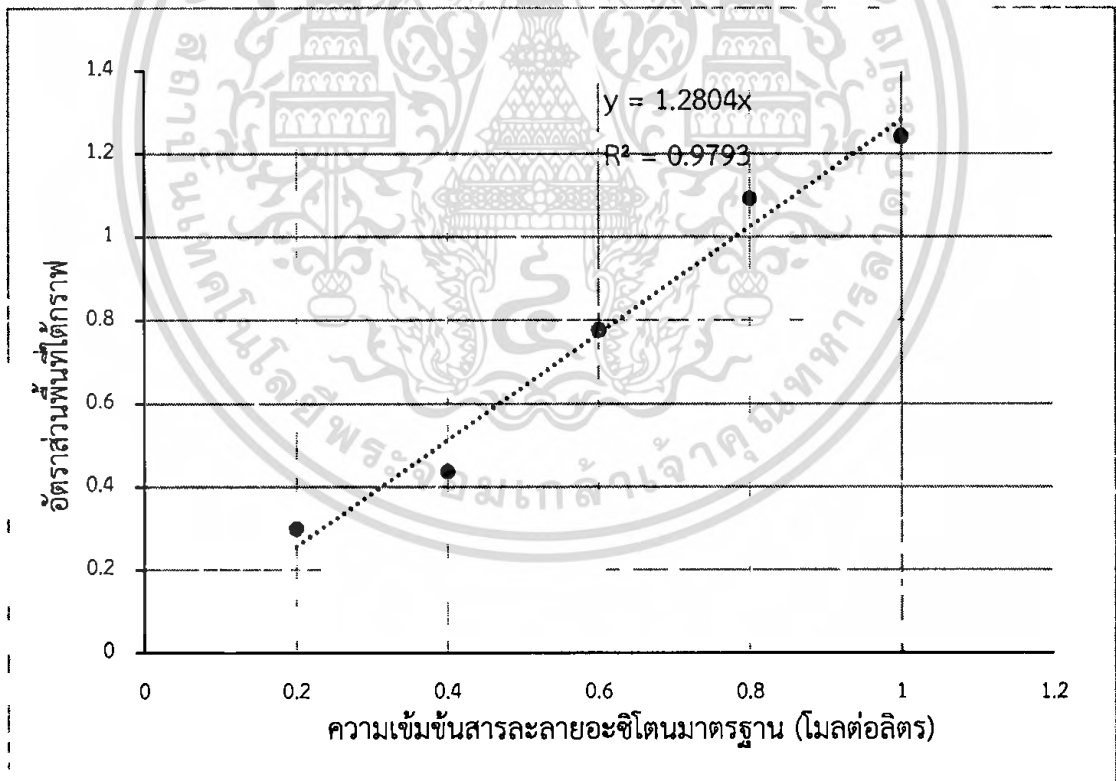
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H Colum ที่มีความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร และทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลาย อะซิโตนมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ อะซิโตน	พื้นที่ใต้กราฟ กรดซिटริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟอะซิโตน ต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก
0.2	723339	2418014	0.299146
0.4	1433936	3278973	0.437313
0.6	1765916	2273957	0.776583
0.8	2503287	2291281	1.092527
1	2786100	2243098	1.242077



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟอะซิโตนต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซिटริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การเตรียมสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐาน

กลีเซอรอลความเข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 92.09 กรัมต่อโมล และ ความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นกลีเซอรอล ( $C_{\text{Glycerol}}$ ) คำนวณจากสูตร

$$C_{\text{Glycerol}} = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}}$$
$$= \frac{10 \times 1.26 \text{ g/ml} \times 99.5 \%}{92.09 \text{ g/mol}}$$
$$= 13.61 \text{ โมลต่อลิตร}$$

การเตรียมสารละลายกลีเซอรอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$13.61 \text{ mol/L} \times V_1 = 1.0 \text{ mol/L} \times 100 \text{ ml}$$
$$V_1 = 7.34 \text{ มิลลิลิตร}$$

การเตรียมสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐาน 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$   
ยกตัวอย่างการเตรียมสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$1 \text{ mol/L} \times V_1 = 0.2 \text{ mol/L} \times 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น สามารถเตรียมสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ใช้กลีเซอรอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.4 โมลต่อลิตร ใช้กลีเซอรอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลต่อลิตร ใช้กลีเซอรอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

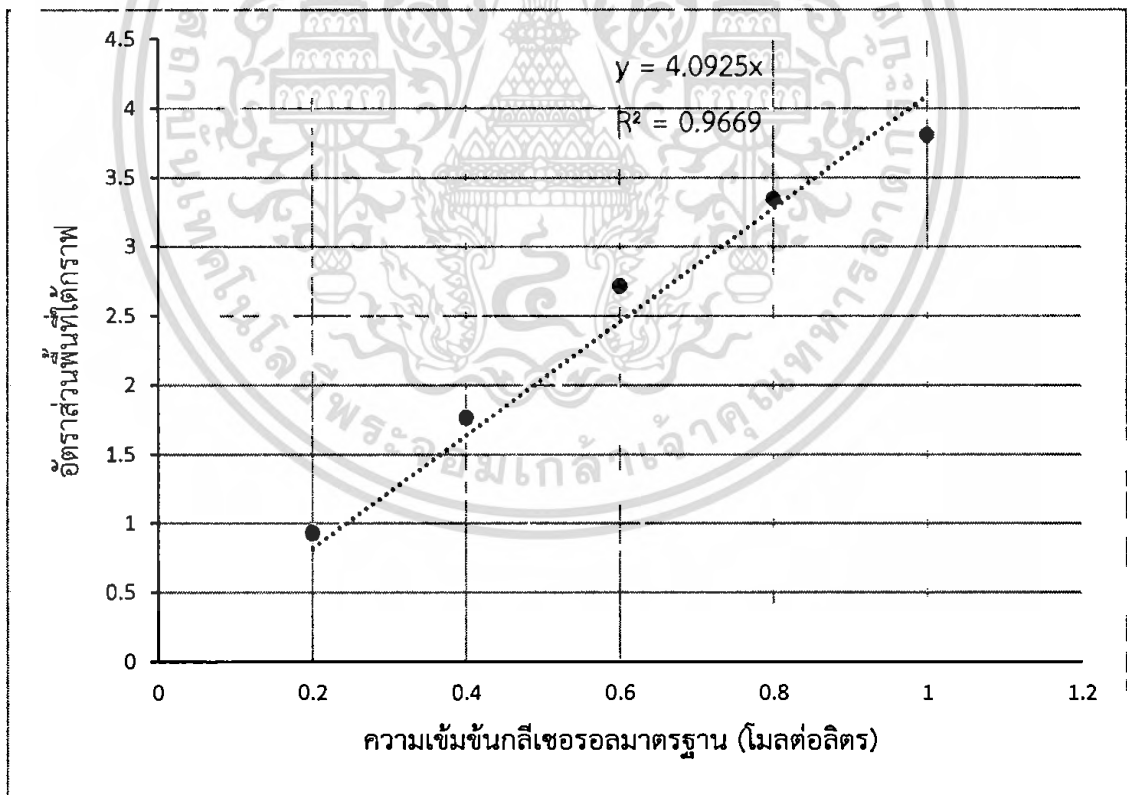
ที่ความเข้มข้น 0.8 โมลต่อลิตร ใช้กลีเซอรอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

และปรับปริมาตรของแต่ละความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานตามความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.4 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกลีเซอรอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H Colum ที่มีความยาว 300 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร และทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ความเข้มข้นสารละลาย กลีเซอรอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟ กลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟ กรดซิดริก	อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล ต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิดริก
0.2	2240577	2409879	0.929747
0.4	4435303	2511745	1.765825
0.6	6765633	2493826	2.712953
0.8	12636932	3778446	3.344479
1	9269789	2434415	3.80781



รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลมาตรฐาน ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง HPLC โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟจากพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอลต่อพื้นที่ใต้กราฟกรดซิดริก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การเตรียมสารละลาย Internal standard

การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่งกรดซัลฟิวริก 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 ปีเปตกรดซัลฟิวริก 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองสาร Cellulose Acetate และนำไป sonicated เพื่อไล่แก๊สออกจากสารละลาย จากนั้นนำไปใช้เป็น Mobile phase ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

คำนวณความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก จากสูตร

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

การเตรียมสารละลายซัลฟิวริก 0.005 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

คำนวณจากสูตร  $C_1V_1 = C_2V_2$

$$\begin{aligned}18.38 \text{ mol/L} \times V_1 &= 0.005 \text{ mol/L} \times 1000 \text{ ml} \\ V_1 &= 0.272 \text{ มิลลิลิตร}\end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่นำมาคัดเลือก 9 สายพันธุ์ การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ 9 สายพันธุ์ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สายพันธุ์	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
R11	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
R16	3	2.0343	1.79356	1.03551	-2.4211	6.4898	.00	3.39
B16	3	.6249	.18925	.10926	.1548	1.0950	.41	.76
B21	3	.7540	1.30601	.75403	-2.4903	3.9983	.00	2.26
C11	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
C13	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
C20	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
C21	3	.7546	1.30693	.75455	-2.4920	4.0011	.00	2.26
C22	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	27	.4631	.97158	.18698	.0787	.8474	.00	3.39

**ตาราง ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.210	8	1.401	1.892	.125
Within Groups	13.333	18	.741		
Total	24.543	26			

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's**

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
R11	3	.0000	
C11	3	.0000	
C13	3	.0000	
C20	3	.0000	
C22	3	.0000	
B16	3	.6249	.6249
B21	3	.7540	.7540
C21	3	.7546	.7546
R16	3		2.0343
Sig.		.357	.080

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ 9 สายพันธุ์ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สายพันธุ์	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
R11	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
R16	3	.2458	.42567	.24576	-.8117	1.3032	.00	.74
B16	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
B21	3	.1893	.32780	.18926	-.6250	1.0036	.00	.57
C11	3	.7282	.63614	.36728	-.8520	2.3085	.00	1.18
C13	3	.7537	.65447	.37786	-.8721	2.3795	.00	1.18
C20	3	.2824	.48909	.28238	-.9326	1.4973	.00	.85
C21	3	.1295	.22436	.12953	-.4278	.6869	.00	.39
C22	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	27	.2588	.43358	.08344	.0872	.4303	.00	1.18

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.065	8	.258	1.647	.180
Within Groups	2.822	18	.157		
Total	4.888	26			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
R11	3	.0000
B16	3	.0000
C22	3	.0000
C21	3	.1295
B21	3	.1893
R16	3	.2458
C20	3	.2824
C11	3	.7282
C13	3	.7537
Sig.		.057

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ 9 สายพันธุ์ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอล ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สายพันธุ์	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
R11	3	20.8967	2.94966	1.70299	13.5694	28.2241	19.07	24.30
R16	3	17.9120	2.15542	1.24443	12.5577	23.2664	16.44	20.39
B16	3	18.9533	3.95710	2.28463	9.1233	28.7833	14.38	21.29
B21	3	15.6396	1.90832	1.10177	10.8990	20.3801	13.84	17.64
C11	3	15.8503	2.42208	1.39839	9.8335	21.8670	14.11	18.62
C13	3	14.3634	2.50052	1.44368	8.1517	20.5750	12.43	17.19
C20	3	19.6542	4.90659	2.83282	7.4656	31.8429	14.10	23.40
C21	3	19.0389	3.91857	2.26239	9.3047	28.7732	14.94	22.74
C22	3	30.5207	10.97109	6.33416	3.2670	57.7744	22.93	43.10
Total	27	19.2032	6.04456	1.16328	16.8121	21.5944	12.43	43.10

**ตาราง ANOVA**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	540.835	8	67.604	2.974	.026
Within Groups	409.121	18	22.729		
Total	949.956	26			

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's**

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
C13	3	14.3634	
B21	3	15.6396	
C11	3	15.8503	
R16	3	17.9120	
B16	3	18.9533	
C21	3	19.0389	
C20	3	19.6542	
R11	3	20.8967	
C22	3		30.5207
Sig.		.158	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ของเชื้อที่สนใจได้แก่ C11 และ C13 ตามช่วงระยะเวลาที่สนใจ นั่นคือ 0 12 24 36 48 60 72 96 และ 120 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ของเชื้อ C11 ที่บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลารวมทั้งหมด 120 ชั่วโมง

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
Acetone	0 Hr.	3	18.2018	.09617	.05552	17.9629	18.4407	18.12	18.31
	12 Hr.	3	18.9020	.72445	.41826	17.1024	20.7017	18.23	19.67
	24 Hr.	3	20.0984	.55227	.31885	18.7265	21.4703	19.69	20.73
	36 Hr.	3	19.2471	.33149	.19139	18.4236	20.0706	18.91	19.58
	48 Hr.	3	18.3261	.88880	.51315	16.1182	20.5340	17.47	19.25
	60 Hr.	3	18.2814	.25942	.14978	17.6370	18.9259	18.03	18.55
	72 Hr.	3	18.5120	.68072	.39302	16.8210	20.2030	17.73	18.97
	96 Hr.	3	19.6422	.40475	.23368	18.6367	20.6477	19.19	19.98
	120 Hr.	3	19.3252	.22203	.12819	18.7737	19.8768	19.10	19.55

	Total	27	18.9485	.77997	.15010	18.6399	19.2570	17.47	20.73
Butanol	0 Hr.	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	12 Hr.	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24 Hr.	3	.4985	.45053	.26012	-.6207	1.6177	.00	.88
	36 Hr.	3	1.7323	.15112	.08725	1.3569	2.1077	1.56	1.85
	48 Hr.	3	1.4860	.17719	.10230	1.0458	1.9261	1.29	1.64
	60 Hr.	3	1.4224	.06047	.03491	1.2722	1.5727	1.35	1.46
	72 Hr.	3	1.4505	.15446	.08918	1.0668	1.8342	1.27	1.55
	96 Hr.	3	1.6252	.04272	.02466	1.5190	1.7313	1.58	1.67
	120 Hr.	3	1.3475	.05540	.03198	1.2099	1.4851	1.29	1.40
	Total	27	1.0625	.68570	.13196	.7912	1.3337	.00	1.85
Ethanol	0 Hr.	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	12 Hr.	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24 Hr.	3	1.5913	.09555	.05517	1.3540	1.8287	1.52	1.70
	36 Hr.	3	2.3403	.16936	.09778	1.9196	2.7611	2.15	2.46
	48 Hr.	3	2.0924	.18851	.10883	1.6241	2.5607	1.90	2.28
	60 Hr.	3	2.1481	.09205	.05315	1.9194	2.3768	2.05	2.24

	72 Hr.	3	2.1205	.17358	.10021	1.6893	2.5516	1.92	2.25
	96 Hr.	3	2.5699	.03819	.02205	2.4751	2.6648	2.53	2.61
	120 Hr.	3	2.2842	.15751	.09094	1.8930	2.6755	2.14	2.45
	Total	27	1.6830	.95602	.18399	1.3048	2.0612	.00	2.61
Glycerol	0 Hr.	3	38.6782	3.21127	1.85403	30.7009	46.6554	36.08	42.27
	12 Hr.	3	23.2004	.33962	.19608	22.3567	24.0440	22.95	23.59
	24 Hr.	3	32.6366	.37355	.21567	31.7086	33.5645	32.21	32.90
	36 Hr.	3	29.0130	.41376	.23888	27.9852	30.0408	28.71	29.48
	48 Hr.	3	27.2792	2.00803	1.15934	22.2910	32.2674	25.47	29.44
	60 Hr.	3	27.7263	1.37690	.79495	24.3059	31.1467	26.44	29.18
	72 Hr.	3	26.9700	2.04484	1.18059	21.8903	32.0496	24.63	28.38
	96 Hr.	3	27.2645	.32177	.18577	26.4652	28.0638	27.02	27.63
	120 Hr.	3	25.7630	.34039	.19653	24.9174	26.6086	25.53	26.15
	Total	27	28.7257	4.50755	.86748	26.9426	30.5088	22.95	42.27

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	10.852	8	1.356	4.917	.002
	Within Groups	4.965	18	.276		
	Total	15.817	26			
Butanol	Between Groups	11.646	8	1.456	45.235	.000
	Within Groups	.579	18	.032		
	Total	12.225	26			
Ethanol	Between Groups	23.487	8	2.936	191.167	.000
	Within Groups	.276	18	.015		
	Total	23.763	26			
Glycerol	Between Groups	486.134	8	60.767	25.960	.000
	Within Groups	42.134	18	2.341		
	Total	528.268	26			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone						
Hours	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 Hr.	3	18.2018				
60 Hr.	3	18.2814	18.2814			
48 Hr.	3	18.3261	18.3261			
72 Hr.	3	18.5120	18.5120	18.5120		
12 Hr.	3	18.9020	18.9020	18.9020	18.9020	
36 Hr.	3		19.2471	19.2471	19.2471	19.2471
120 Hr.	3			19.3252	19.3252	19.3252
96 Hr.	3				19.6422	19.6422
24 Hr.	3					20.0984
Sig.		.158	.056	.097	.129	.083

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Butanol					
Hours	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0 Hr.	3	.0000			
12 Hr.	3	.0000			
24 Hr.	3		.4985		
120 Hr.	3			1.3475	
60 Hr.	3			1.4224	1.4224
72 Hr.	3			1.4505	1.4505
48 Hr.	3			1.4860	1.4860
96 Hr.	3			1.6252	1.6252
36 Hr.	3				1.7323
Sig.		1.000	1.000	.104	.071

ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Ethanol						
Hours	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 Hr.	3	.0000				
12 Hr.	3	.0000				
24 Hr.	3		1.5913			
48 Hr.	3			2.0924		
72 Hr.	3			2.1205	2.1205	
60 Hr.	3			2.1481	2.1481	
120 Hr.	3			2.2842	2.2842	
36 Hr.	3				2.3403	
96 Hr.	3					2.5699
Sig.		1.000	1.000	.097	.060	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol						
Hours	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
12 Hr.	3	23.2004				
120 Hr.	3	25.7630	25.7630			
72 Hr.	3		26.9700	26.9700		
96 Hr.	3		27.2645	27.2645		
48 Hr.	3		27.2792	27.2792		
60 Hr.	3		27.7263	27.7263		
36 Hr.	3			29.0130		
24 Hr.	3				32.6366	
0 Hr.	3					38.6782
Sig.		.055	.173	.157	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่เติมกลีเซอรอลบริสุทธิ์ ของเชื้อ C13 ที่บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลารวมทั้งหมด 120 ชั่วโมง

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
Acetone	0 hr	3	.0621	.10764	.06214	-.2052	.3295	.00	.19
	12 hr	3	.1017	.17612	.10168	-.3358	.5392	.00	.31
	24 hr	3	1.2791	.11510	.06645	.9932	1.5650	1.16	1.39
	36 hr	3	2.2025	.09929	.05732	1.9559	2.4491	2.09	2.28
	48 hr	3	1.3066	.01990	.01149	1.2571	1.3560	1.29	1.33
	60 hr	3	.8701	.06740	.03892	.7027	1.0375	.79	.91
	72 hr	3	.5199	.02948	.01702	.4466	.5931	.49	.55
	96 hr	3	.4686	.12112	.06993	.1677	.7695	.36	.60
	120 hr	3	.3710	.13752	.07940	.0294	.7127	.22	.50

	Total	27	.7980	.67361	.12964	.5315	1.0644	.00	2.28
Butanol	0 hr	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	12 hr	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24 hr	3	.1169	.01900	.01097	.0697	.1641	.10	.13
	36 hr	3	.7139	.14679	.08475	.3493	1.0786	.55	.82
	48 hr	3	1.5214	.02929	.01691	1.4486	1.5941	1.50	1.56
	60 hr	3	2.1063	.16252	.09383	1.7026	2.5100	1.92	2.22
	72 hr	3	2.6546	.17359	.10022	2.2234	3.0859	2.46	2.79
	96 hr	3	2.3578	.22350	.12904	1.8026	2.9130	2.11	2.54
	120 hr	3	2.1038	.38792	.22397	1.1402	3.0675	1.68	2.43
	Total	27	1.2861	1.05285	.20262	.8696	1.7026	.00	2.79
Ethanol	0 hr	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	12 hr	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	24 hr	3	.2668	.02697	.01557	.1998	.3338	.24	.29
	36 hr	3	.5055	.11754	.06786	.2135	.7975	.37	.60

	48 hr	3	.9049	.00255	.00147	.8986	.9112	.90	.91
	60 hr	3	1.3363	.14835	.08565	.9678	1.7048	1.17	1.44
	72 hr	3	1.5898	.36869	.21286	.6739	2.5056	1.20	1.93
	96 hr	3	1.7309	.11903	.06872	1.4352	2.0266	1.59	1.81
	120 hr	3	1.4975	.36500	.21073	.5908	2.4042	1.10	1.82
	Total	27	.8702	.68742	.13229	.5983	1.1421	.00	1.93
Glycerol	0 hr	3	35.9113	1.08633	.62719	33.2127	38.6099	34.99	37.11
	12 hr	3	36.5194	2.00095	1.15525	31.5487	41.4900	34.83	38.73
	24 hr	3	31.8581	.94937	.54812	29.4997	34.2164	30.76	32.46
	36 hr	3	31.4224	.75727	.43721	29.5412	33.3035	30.77	32.26
	48 hr	3	23.6247	.62900	.36316	22.0622	25.1873	23.19	24.35
	60 hr	3	23.9300	.59303	.34238	22.4569	25.4032	23.26	24.40
	72 hr	3	23.7656	.40422	.23338	22.7615	24.7698	23.30	24.03
	96 hr	3	22.3210	3.82002	2.20549	12.8315	31.8104	18.18	25.70
	120 hr	3	21.3654	2.63352	1.52046	14.8233	27.9074	18.33	23.06
	Total	27	27.8575	5.98930	1.15264	25.4882	30.2268	18.18	38.73

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	11.587	8	1.448	124.030	.000
	Within Groups	.210	18	.012		
	Total	11.797	26			
Butanol	Between Groups	28.262	8	3.533	113.655	.000
	Within Groups	.559	18	.031		
	Total	28.821	26			
Ethanol	Between Groups	11.646	8	1.456	40.959	.000
	Within Groups	.640	18	.036		
	Total	12.286	26			
Glycerol	Between Groups	874.470	8	109.309	33.810	.000
	Within Groups	58.195	18	3.233		
	Total	932.665	26			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone						
Hour	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 hr	3	.0621				
12 hr	3	.1017				
120 hr	3		.3710			
96 hr	3		.4686			
72 hr	3		.5199			
60 hr	3			.8701		
24 hr	3				1.2791	
48 hr	3				1.3066	
36 hr	3					2.2025
Sig.		.659	.127	1.000	.759	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่ได้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Butanol						
Hour	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 hr	3	.0000				
12 hr	3	.0000				
24 hr	3	.1169				
36 hr	3		.7139			
48 hr	3			1.5214		
120 hr	3				2.1038	
60 hr	3				2.1063	
96 hr	3				2.3578	2.3578
72 hr	3					2.6546
Sig.		.453	1.000	1.000	.111	.054

ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Ethanol						
Hour	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 hr	3	.0000				
12 hr	3	.0000				
24 hr	3	.2668	.2668			
36 hr	3		.5055			
48 hr	3			.9049		
60 hr	3				1.3363	
120 hr	3				1.4975	1.4975
72 hr	3				1.5898	1.5898
96 hr	3					1.7309
Sig.		.117	.138	1.000	.135	.167

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol				
Hour	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
120 hr	3	21.3654		
96 hr	3	22.3210		
48 hr	3	23.6247		
72 hr	3	23.7656		
60 hr	3	23.9300		
36 hr	3		31.4224	
24 hr	3		31.8581	
0 hr	3			35.9113
12 hr	3			36.5194
Sig.		.132	.770	.684

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่ใช้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ กลีเซอรอลบริสุทธิ์ และ กลีเซอรอลดิบ ของเชื้อ C13 ในชั่วโมงที่ 0 และ 72

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน ของเชื้อ C13 ในชั่วโมงที่ 0

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

		จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
						ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
Acetone	10 g/L	3	.8185	.34009	.19635	-.0263	1.6634	.44	1.10
	20 g/L	3	.8101	.26648	.15385	.1481	1.4720	.52	1.05
	30 g/L	3	.7955	.02647	.01528	.7297	.8613	.77	.82
	40 g/L	3	.9131	.16550	.09555	.5020	1.3242	.72	1.03
	50 g/L	3	.6391	.55971	.32315	-.7513	2.0295	.00	1.04
	Total	15	.7953	.28948	.07474	.6350	.9556	.00	1.10
Butanol	10 g/L	3	.1305	.06949	.04012	-.0422	.3031	.07	.20
	20 g/L	3	.0900	.03040	.01755	.0145	.1655	.06	.12
	30 g/L	3	.0907	.01024	.00591	.0653	.1161	.08	.10
	40 g/L	3	.1072	.00355	.00205	.0984	.1160	.10	.11
	50 g/L	3	.0539	.04794	.02768	-.0652	.1730	.00	.09

	Total	15	.0944	.04289	.01107	.0707	.1182	.00	.20
Ethanol	10 g/L	3	.7843	.52076	.30066	-.5093	2.0780	.40	1.38
	20 g/L	3	.7267	.28502	.16455	.0186	1.4347	.42	.99
	30 g/L	3	.5153	.07150	.04128	.3376	.6929	.44	.58
	40 g/L	3	.7584	.17558	.10137	.3223	1.1946	.56	.87
	50 g/L	3	.5133	.06213	.03587	.3590	.6677	.44	.56
	Total	15	.6596	.26734	.06903	.5116	.8077	.40	1.38
Glycerol	10 g/L	3	12.3568	.74368	.42936	10.5094	14.2042	11.67	13.14
	20 g/L	3	25.4372	5.40836	3.12252	12.0021	38.8724	19.20	28.89
	30 g/L	3	43.1058	2.12899	1.22917	37.8171	48.3946	41.01	45.26
	40 g/L	3	44.2953	.47122	.27206	43.1247	45.4659	43.83	44.78
	50 g/L	3	69.1996	.69652	.40214	67.4694	70.9299	68.45	69.82
	Total	15	38.8790	20.03933	5.17413	27.7815	49.9764	11.67	69.82

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	.117	4	.029	.277	.886
	Within Groups	1.056	10	.106		
	Total	1.173	14			
Butanol	Between Groups	.009	4	.002	1.441	.291
	Within Groups	.016	10	.002		
	Total	.026	14			
Ethanol	Between Groups	.216	4	.054	.689	.616
	Within Groups	.784	10	.078		
	Total	1.001	14			
Glycerol	Between Groups	5551.959	4	1387.990	198.040	.000
	Within Groups	70.086	10	7.009		
	Total	5622.045	14			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone		
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
50 g/L	3	.6391
30 g/L	3	.7955
20 g/L	3	.8101
10 g/L	3	.8185
40 g/L	3	.9131
Sig.		.363

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Butanol		
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
50 g/L	3	.0539
20 g/L	3	.0900
30 g/L	3	.0907
40 g/L	3	.1072
10 g/L	3	.1305
Sig.		.059

ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Ethanol		
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
50 g/L	3	.5133
30 g/L	3	.5153
20 g/L	3	.7267
40 g/L	3	.7584
10 g/L	3	.7843
Sig.		.300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol					
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10 g/L	3	12.3568			
20 g/L	3		25.4372		
30 g/L	3			43.1058	
40 g/L	3			44.2953	
50 g/L	3				69.1996
Sig.		1.000	1.000	.594	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลบริสุทธิ์ที่ต่างกัน ของเชื้อ C13 ที่บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาที่ 72

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
Acetone	10 g/L	3	.9289	.02541	.01467	.8658	.9920	.91	.96
	20 g/L	3	.9831	.11943	.06896	.6865	1.2798	.85	1.07
	30 g/L	3	.5600	.15619	.09017	.1720	.9480	.41	.72
	40 g/L	3	.1677	.01671	.00965	.1262	.2092	.16	.19
	50 g/L	3	.2375	.05170	.02985	.1090	.3659	.18	.28
	Total	15	.5754	.35858	.09258	.3769	.7740	.16	1.07
Butanol	10 g/L	3	2.7229	.63477	.36648	1.1460	4.2997	1.99	3.12
	20 g/L	3	2.9798	.04725	.02728	2.8625	3.0972	2.93	3.03
	30 g/L	3	3.2632	.30276	.17480	2.5111	4.0153	3.05	3.61
	40 g/L	3	2.3639	.03635	.02098	2.2736	2.4542	2.34	2.41
	50 g/L	3	2.7967	.53777	.31048	1.4608	4.1326	2.20	3.23
	Total	15	2.8253	.45467	.11740	2.5735	3.0771	1.99	3.61

Ethanol	10 g/L	3	3.5954	.58221	.33614	2.1491	5.0417	3.03	4.19
	20 g/L	3	3.3009	.05129	.02962	3.1734	3.4283	3.25	3.35
	30 g/L	3	2.9636	.53558	.30922	1.6332	4.2941	2.35	3.31
	40 g/L	3	1.6794	.02133	.01231	1.6264	1.7323	1.66	1.70
	50 g/L	3	1.7948	.33942	.19597	.9517	2.6380	1.42	2.07
	Total	15	2.6668	.87634	.22627	2.1815	3.1521	1.42	4.19
Glycerol	10 g/L	3	13.8212	.42509	.24543	12.7652	14.8771	13.40	14.25
	20 g/L	3	19.9996	.14931	.08621	19.6287	20.3705	19.83	20.11
	30 g/L	3	34.7822	.39635	.22883	33.7976	35.7668	34.33	35.08
	40 g/L	3	38.9258	1.85205	1.06928	34.3251	43.5265	36.79	40.11
	50 g/L	3	53.5789	6.44326	3.72002	37.5730	69.5849	46.86	59.70
	Total	15	32.2215	14.82611	3.82808	24.0111	40.4320	13.40	59.70

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	1.716	4	.429	50.749	.000
	Within Groups	.085	10	.008		
	Total	1.800	14			
Butanol	Between Groups	1.319	4	.330	2.095	.156
	Within Groups	1.575	10	.157		
	Total	2.894	14			
Ethanol	Between Groups	9.263	4	2.316	15.561	.000
	Within Groups	1.488	10	.149		
	Total	10.752	14			
Glycerol	Between Groups	2986.777	4	746.694	82.406	.000
	Within Groups	90.611	10	9.061		
	Total	3077.389	14			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone				
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
40 g/L	3	.1677		
50 g/L	3	.2375		
30 g/L	3		.5600	
10 g/L	3			.9289
20 g/L	3			.9831
Sig.		.375	1.000	.487

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Butanol			
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
40 g/L	3	2.3639	
10 g/L	3	2.7229	2.7229
50 g/L	3	2.7967	2.7967
20 g/L	3	2.9798	2.9798
30 g/L	3		3.2632
Sig.		.107	.151

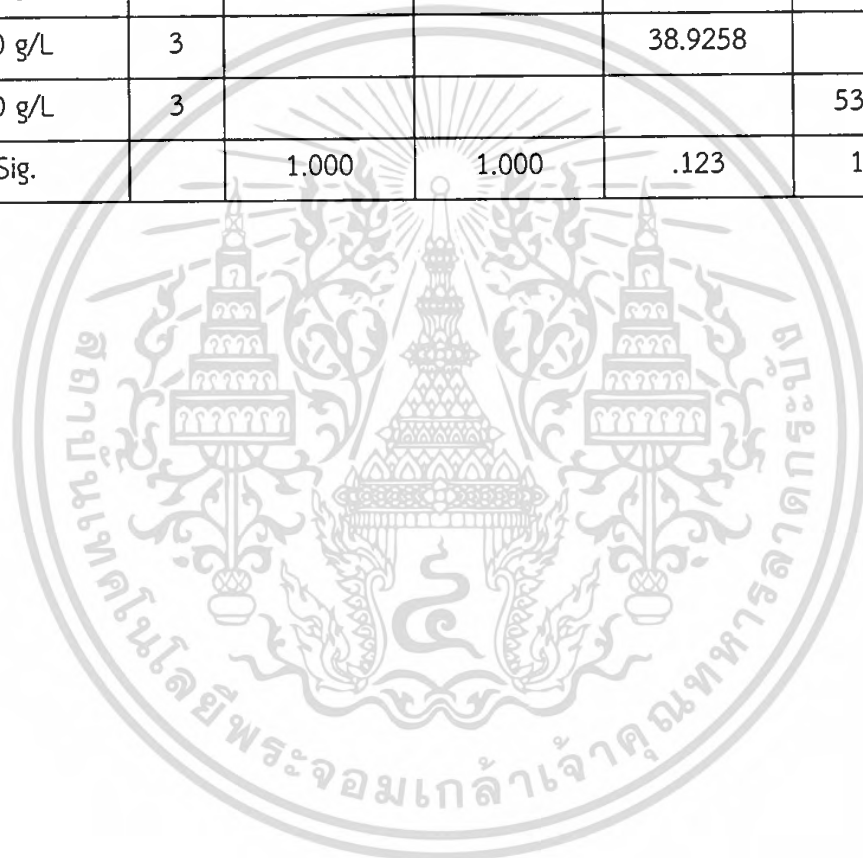
ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Ethanol			
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
40 g/L	3	1.6794	
50 g/L	3	1.7948	
30 g/L	3		2.9636
20 g/L	3		3.3009
10 g/L	3		3.5954
Sig.		.722	.084

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol					
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
10 g/L	3	13.8212			
20 g/L	3		19.9996		
30 g/L	3			34.7822	
40 g/L	3			38.9258	
50 g/L	3				53.5789
Sig.		1.000	1.000	.123	1.000



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่แตกต่างกัน ของเชื้อ C13 ในชั่วโมงที่ 0

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

		จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
						ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
Acetone	1 g/L	3	.1629	.00378	.00218	.1536	.1723	.16	.17
	2 g/L	3	.1801	.00538	.00311	.1668	.1935	.17	.18
	3 g/L	3	.2064	.01801	.01040	.1617	.2512	.19	.22
	4 g/L	3	.2275	.00164	.00095	.2234	.2316	.23	.23
	5 g/L	3	.1984	.02454	.01417	.1374	.2593	.17	.22
	Total	15	.1951	.02575	.00665	.1808	.2093	.16	.23
Butanol	1 g/L	3	.0676	.02290	.01322	.0107	.1245	.05	.09
	2 g/L	3	.0830	.00710	.00410	.0653	.1006	.08	.09
	3 g/L	3	.0675	.01601	.00924	.0278	.1073	.06	.09
	4 g/L	3	.1008	.00525	.00303	.0877	.1138	.10	.11
	5 g/L	3	.1067	.01673	.00966	.0652	.1483	.09	.12
	Total	15	.0851	.02117	.00547	.0734	.0968	.05	.12
Ethanol	1 g/L	3	.0997	.01821	.01051	.0545	.1449	.08	.12

	2 g/L	3	.1389	.00559	.00323	.1251	.1528	.13	.14
	3 g/L	3	.1218	.02448	.01413	.0610	.1826	.11	.15
	4 g/L	3	.1597	.00723	.00418	.1418	.1777	.15	.17
	5 g/L	3	.1552	.02046	.01181	.1043	.2060	.13	.17
	Total	15	.1351	.02703	.00698	.1201	.1500	.08	.17
Glycerol	1 g/L	3	13.8212	.42509	.24543	12.7652	14.8771	13.40	14.25
	2 g/L	3	19.9996	.14931	.08621	19.6287	20.3705	19.83	20.11
	3 g/L	3	34.7822	.39635	.22883	33.7976	35.7668	34.33	35.08
	4 g/L	3	38.9258	1.85205	1.06928	34.3251	43.5265	36.79	40.11
	5 g/L	3	10.1486	.81530	.47071	8.1233	12.1739	9.22	10.74
	Total	15	23.5355	11.82370	3.05287	16.9877	30.0832	9.22	40.11

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	.007	4	.002	9.432	.002
	Within Groups	.002	10	.000		
	Total	.009	14			
Butanol	Between Groups	.004	4	.001	4.389	.026
	Within Groups	.002	10	.000		
	Total	.006	14			
Ethanol	Between Groups	.007	4	.002	6.422	.008
	Within Groups	.003	10	.000		
	Total	.010	14			
Glycerol	Between Groups	1948.289	4	487.072	546.672	.000
	Within Groups	8.910	10	.891		
	Total	1957.198	14			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone				
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1 g/L	3	.1629		
2 g/L	3	.1801	.1801	
5 g/L	3		.1984	
3 g/L	3		.2064	.2064
4 g/L	3			.2275
Sig.		.162	.052	.094

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Butanol			
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3 g/L	3	.0675	
1 g/L	3	.0676	
2 g/L	3	.0830	.0830
4 g/L	3		.1008
5 g/L	3		.1067
Sig.		.260	.095

ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Ethanol				
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1 g/L	3	.0997		
3 g/L	3	.1218	.1218	
2 g/L	3		.1389	.1389
5 g/L	3			.1552
4 g/L	3			.1597
Sig.		.140	.244	.182

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol						
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
5 g/L	3	10.1486				
1 g/L	3		13.8212			
2 g/L	3			19.9996		
3 g/L	3				34.7822	
4 g/L	3					38.9258
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และกลีเซอรอล ในอาหาร T6 ที่ใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลดิบที่แตกต่างกัน ของเชื้อ C13 ที่บ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 72

ตารางค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
Acetone	1 g/L	3	2.2403	.12011	.06934	1.9419	2.5386	2.17	2.38
	2 g/L	3	2.2508	.21736	.12549	1.7108	2.7907	2.00	2.40
	3 g/L	3	2.1377	.17751	.10248	1.6967	2.5786	1.99	2.33
	4 g/L	3	1.8502	.02448	.01413	1.7894	1.9110	1.82	1.87
	5 g/L	3	1.7389	.02944	.01700	1.6658	1.8120	1.71	1.77
	Total	15	2.0436	.24661	.06367	1.9070	2.1801	1.71	2.40
Butanol	1 g/L	3	1.7358	.11892	.06866	1.4403	2.0312	1.62	1.85
	2 g/L	3	2.3947	.23043	.13304	1.8223	2.9672	2.14	2.58
	3 g/L	3	2.5212	.22504	.12993	1.9622	3.0802	2.28	2.73
	4 g/L	3	2.6985	.08318	.04802	2.4919	2.9051	2.61	2.77
	5 g/L	3	2.7842	.23089	.13330	2.2106	3.3578	2.54	2.99
	Total	15	2.4269	.41605	.10742	2.1965	2.6573	1.62	2.99

Ethanol	1 g/L	3	2.9328	.13471	.07777	2.5982	3.2675	2.84	3.09
	2 g/L	3	3.8851	.51259	.29594	2.6118	5.1585	3.35	4.37
	3 g/L	3	3.7357	.35131	.20283	2.8631	4.6084	3.46	4.13
	4 g/L	3	4.0525	.19861	.11467	3.5591	4.5458	3.82	4.17
	5 g/L	3	3.9482	.35535	.20516	3.0655	4.8309	3.54	4.20
	Total	15	3.7109	.50484	.13035	3.4313	3.9904	2.84	4.37
Glycerol	1 g/L	3	1.2904	.10427	.06020	1.0314	1.5494	1.17	1.36
	2 g/L	3	1.5805	.29495	.17029	.8478	2.3132	1.30	1.89
	3 g/L	3	1.8774	.16672	.09626	1.4632	2.2916	1.70	2.03
	4 g/L	3	2.8360	.09154	.05285	2.6086	3.0634	2.74	2.93
	5 g/L	3	3.4007	.20369	.11760	2.8947	3.9067	3.24	3.63
	Total	15	2.1970	.83817	.21642	1.7328	2.6612	1.17	3.63

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	.662	4	.166	8.745	.003
	Within Groups	.189	10	.019		
	Total	.851	14			
Butanol	Between Groups	2.067	4	.517	14.507	.000
	Within Groups	.356	10	.036		
	Total	2.423	14			
Ethanol	Between Groups	2.428	4	.607	5.324	.015
	Within Groups	1.140	10	.114		
	Total	3.568	14			
Glycerol	Between Groups	9.484	4	2.371	67.541	.000
	Within Groups	.351	10	.035		
	Total	9.836	14			

ตารางแสดงความแตกต่างของ Acetone อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Acetone			
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5 g/L	3	1.7389	
4 g/L	3	1.8502	
3 g/L	3		2.1377
1 g/L	3		2.2403
2 g/L	3		2.2508
Sig.		.345	.359

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Butanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Butanol				
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1 g/L	3	1.7358		
2 g/L	3		2.3947	
3 g/L	3		2.5212	2.5212
4 g/L	3		2.6985	2.6985
5 g/L	3			2.7842
Sig.		1.000	.089	.134

ตารางแสดงความแตกต่างของ Ethanol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ

Duncan's

Ethanol			
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1 g/L	3	2.9328	
3 g/L	3		3.7357
2 g/L	3		3.8851
5 g/L	3		3.9482
4 g/L	3		4.0525
Sig.		1.000	.309

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างของ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยการทดสอบแบบ Duncan's

Glycerol					
Concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1 g/L	3	1.2904			
2 g/L	3	1.5805	1.5805		
3 g/L	3		1.8774		
4 g/L	3			2.8360	
5 g/L	3				3.4007
Sig.		.087	.081	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้