# การใช้กากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้

# UTILIZATION OF SOYBEAN MILL FOR CULTIVATION OF ISOLATED *Clostridium* sp.


ชลธิชา สระบัว

ณัชชา เหมนุสรณานนท์

พรนภา เนื่องพะนอม


รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2559


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# UTILIZATION OF SOYBEAN MILL FOR CULTIVATION OF ISOLATED *Clostridium* sp.

CHONTHICHA SABUA

NUTCHA HEMNUSORNNANON

PHORNNAPA NUANGPANOM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การใช้กากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้<br>Utilization of Soybean Mill for Cultivation of Isolated *Clostridium* sp. |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวชลธิชา สระบัว รหัสประจำตัว 56050825<br>นางสาวณัชชา เหมนุสรณานนท์ รหัสประจำตัว 56050830<br>นางสาวพรนภา เนื่องพะนอม รหัสประจำตัว 56050869 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2559 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2559

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| รศ.ดวงใจ โอชัยกุล<br>ประธานกรรมการ | |
| ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล<br>กรรมการ | |
| ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การใช้กากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้ |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวชลธิชา สระบัว รหัสประจำตัว 56050825 |
| | นางสาวณัชชา เหมนุสรณานนท์ รหัสประจำตัว 56050830 |
| | นางสาวพรนภา เนื่องพะนอม รหัสประจำตัว 56050869 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2559 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ |


## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและความร้อนเพื่อให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้โดยนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ บิวทานอล เอทานอล และ อะซิโตน โดยนำวัตถุดิบกากถั่วเหลืองมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีแล้วนำไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.02 ถึง 0.1 นอร์มอล และนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วด้วยเวลาที่แตกต่างกัน คือ 10-30 นาที เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้และน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีค่าสูงสุดทางสถิติ พบว่าการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล ให้ความร้อนเป็นเวลา 20 นาทีได้ผลดีที่สุดโดยได้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้เท่ากับ 24.450 ±2.211 กรัมต่อลิตรและได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 13.116 ±1.087 กรัมต่อลิตร นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยใช้แทนที่ยีสต์สกัดและทริปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเป็นชุดทดลอง จากผลการทดลองพบว่าบิวทานอลที่ได้จากชุดควบคุมมีปริมาณมากกว่าชุดทดลองโดยในชุดทดลองได้เท่ากับ 10.803 ±0.441 กรัมต่อลิตร และในชุดควบคุมได้เท่ากับ 12.146 ±0.074 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากชุดทดลองมีความเข้มข้นมากกว่าชุดควบคุมคือ 0.319 ±0.034 และ 0.150 ±0.151 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของอะซิโตนที่ได้จากชุดทดลองมีความเข้มข้น 3.317 ±0.105 กรัมต่อลิตร และชุดควบคุมเท่ากับ 3.164 ±0.086 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้สามารถใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนได้ เพียงแต่ต้องการกระบวนการย่อยที่เหมาะสมให้ได้แหล่งคาร์บอนและโปรตีนมากขึ้น


**คำสำคัญ**: กระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล, การย่อยด้วยกรด, กากถั่วเหลือง, สภาวะไร้ออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Title** | Utilization of soybean mill for cultivation of Isolated *Clostridium* sp. | | |
| **Students** | Miss Chonthicha | Sabua | Student ID 56050825 |
| | Miss Nutcha | Hemnusoornnanon | Student ID 56050830 |
| | Miss Phornnapa | Nuangpanom | Student ID 56050869 |
| **Degree** | Bachelor of Science (Biotechnology) | | |
| **Department** | Biology | | |
| **Faculty** | Science | | |
| **University** | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) | | |
| **Academic Year** | 2016 | | |
| **Advisor** | Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D. | | |



## Abstract

The aim of study was to investigate the cultivation of isolated *Clostridium* sp. Using soybean mill hydrolysate as a nitrogen and carbon source in fermentation medium (T6). Soybean mill was analyzed for the chemical compositions and was hydrolyzed with 0.02 to 0.1 N of hydrochloric and sulfuric acids, and was heated at 121 °C for 10-30 minutes. To investigate the effect of acid concentration and heat period, the liquid fraction was analyzed for the concentrations of reducing sugar and soluble protein. The result showed that hydrolyzing soybean with 0.1 N HCl and 20 minutes in autoclave were the best conditions ($p < 0.05$). The concentration of protein was 24.450 ±2.211 g/L and that of reducing sugar was 13.116 ±1.087 g/L. To study the effect of nitrogen and carbon source replacement in T6 medium, soybean mill hydrolysate was utilized replacing yeast extract and tryptone for 5 g/L soluable protein and used as a carbon source with the addition of glucose for 50 g/L reducing sugar. It has been found that the butanol concentration was lower than 10.803 ±0.441 g/L that of control T6 medium (12.164 ±0.074 g/L). The ethanol production was improved from 0.151 ±0.039 g/L (control) to 0.319 ±0.034 g/L (soybean mill). There was no significant difference ($p < 0.05$) between control and soybean mill replacement experiments observed in acetone production (3.164 ±0.086 g/L and 3.317 ±0.015 g/L repectively). These results demonstrated that the isolated *Clostridium* sp. was able to uptake the nitrogen and carbon source contained in the hydrolyzed soybean mill, however the optimum conditions of soybean mill hydrolysis were required for more carbon and protein source.


**Keyword**: ABE fermentation, acid hydrolysis, soybean mill, anaerobic condition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับความรู้และประสบการณ์มากมายที่ได้จากการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ ซึ่งจะสำเร็จลุล่วงมิได้หากขาดผู้ให้การสนับสนุนช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ขอขอบคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้คำปรึกษาในด้านวิชาการ ถ่ายถอดความรู้ ตลอดจนให้คำแนะนำในด้านการแปลเอกสาร เอื้อเฟื้อเวลา และสถานที่ในการร่วมแลกเปลี่ยนความคิดเห็นระหว่างการทำโครงงานพิเศษใส่ใจเป็นอย่างดีในทุกขั้นตอน คณะผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษและยังเป็นผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบความถูกต้องรวมทั้งให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย ขอขอบพระคุณผศ.ดร.สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ที่คอยให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษาในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีทดลองทางวิทยาศาสตร์ รวมถึงอำนวยความสะดวกในการทดลอง และขอขอบคุณนางสาวบุษบา บัวเขียว ที่คอยช่วยเหลือและให้คำปรึกษาตลอดการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณ บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด พระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ ที่ให้ความอนุเคราะห์กากถั่วเหลือง รวมไปถึงห้องปฏิบัติการวัชรินทร์ที่ให้คำปรึกษาในการทดลองโดยไม่คิดค่าใช้จ่าย

ขอบคุณบิดา มารดา ที่มอบโอกาสให้ได้ศึกษาเล่าเรียน ส่งเสริมสนับสนุน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ขอบคุณเพื่อนๆกลุ่มโครงงานพิเศษที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกัน รวมไปถึงเพื่อนทั้งในและต่างสาขาที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำ

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์ที่ได้จากโครงงานพิเศษฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบแด่ทุกท่านที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ ขอบคุณค่ะ

ชลธิชา สระบัว
ณัชชา เหมนุสรณานนท์
พรนภา เนื่องพะนอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญรูป | ฉ |
| สารบัญตาราง | ซ |
| **บทที่ 1 บทนำ** | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| **บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 3 |
| 2.1 บิวทานอล | 3 |
| 2.2 *Clostridium* sp. | 5 |
| 2.3 ถั่วเหลือง | 10 |
| 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 13 |
| **บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** | 15 |
| 3.1 วัสดุและอุปกรณ์ | 15 |
| 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ | 17 |
| 3.3 กากถั่วเหลือง | 18 |
| 3.4 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรด | 18 |
| 3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. | 19 |
| 3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง | 19 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| **บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล** | 25 |
| 4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบถั่วเหลือง | 25 |
| 4.2 การย่อยกากถั่วเหลืองให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงที่สุด | 26 |
| 4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. | 33 |
| **บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ** | 44 |
| 5.1 สรุปผลการวิจัย | 44 |
| 5.2 ข้อเสนอแนะ | 46 |
| เอกสารอ้างอิง | 47 |
| ภาคผนวก | 51 |
| ภาคผนวก ก | 52 |
| ภาคผนวก ข | 73 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล | 3 |
| 2.2 | วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) | 6 |
| 2.3 | ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* | 8 |
| 2.4 | วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* | 8 |
| 2.5 | ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* | 9 |
| 2.6 | ถั่วเหลือง | 11 |
| 4.1 | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 31 |
| 4.2 | ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 31 |
| 4.3 | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 32 |
| 4.4 | ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 32 |
| 4.5 | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส | 35 |
| 4.6 | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง | 36 |
| 4.7 | น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดและทริปโตน | 37 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

4.8 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. จากอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง 37

4.9 ปริมาณกรดอะซิติก บิวทีริก และแลกติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน 41

4.10 ปริมาณกรดอะซิติก บิวทีริก และแลกติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง 42

4.11 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน 43

4.12 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง 43


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 ส่วนประกอบของถั่วเหลืองโดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง | 11 |
| 2.2 ส่วนประกอบของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ | 12 |
| 4.1 องค์ประกอบของถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง | 25 |
| 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกด้วยความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 28 |
| 4.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกด้วยความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว | 29 |
| 4.4 ตาราง ANOVA ของการเปรียบเทียบชนิดกรด ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ความร้อนที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน | 30 |
| 4.5 ชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์ที่ได้จากตัวอย่างลำต้นมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก | 33 |
| 4.6 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน | 35 |
| 4.7 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง | 36 |
| 4.8 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดแลคติก บิวทิริก และอะซิติกที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน | 38 |
| 4.9 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดแลคติก บิวทิริก และอะซิติกที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง | 39 |
| 4.10ปริมาณผลิตภัณฑ์ บิวทานอล เอทานอล อะซิโตน และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองทางสถิติ | 42 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันบิวทานอลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนนำไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิล อะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสีนอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำละลาย ในด้านพลังงานไบโอบิวทานอล มีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน (น้ำมันเบนซิน) บิวทานอลมีความเป็นขั้วต่ำกว่า จึงสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ การใช้บิวทานอลไม่ต้องปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเครื่องยนต์เดินได้ตามปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีน (ชนิกา และคณะ, 2555)

กระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตบิวทานอลนั้นเกิดจากการนำเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการหมัก เชื้อ *Clostridium* sp. เป็นหนึ่งในเชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้นำมาศึกษาในการผลิต บิวทานอลโดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลหัวบีตอ้อย แป้งชนิดต่างๆ เช่นจากข้าวสาลี ข้าวโพด ตลอดจนมีงานวิจัยที่พัฒนาการใช้เซลลูโลสและของเหลือจากภาคเกษตรมาใช้เป็นสารตั้งต้น (จันทรัสม์ และคณะ, 2560) ซึ่ง *Clostridium* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของเชื้อ *Clostridium* sp. ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) บิวทานอล (butanol) เอทานอล (ethanol) อะซิโตน (acetone) (กฤศกา และคณะ, 2553)

ข้อมูลจากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ระบุว่าจากการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองพบว่าในกากถั่วเหลืองมีปริมาณใยอาหารสูงถึงร้อยละ 34.89 ต่อน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 39.98 แหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุด (เพลินใจ และคณะ, 2538) มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายตัวแต่มี Cysteine และ Methionine ในระดับต่ำโดยเฉพาะ Methionine มีน้อยมากจึงถูกจัดเป็นกรดอะมิโนจำกัด เม็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณ 38% ไขมัน 16–21% แต่เมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ย 44% อาจถึง 50% ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดน้ำมันและขนาดของเมล็ด (สุกัญญา, 2539)

โครงงานพิเศษนี้จึงต้องการศึกษาการนำวัสดุที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง คือ กากถั่วเหลือง ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ดังนั้น ในโครงงานนี้ จึงศึกษาการนำกากถั่วเหลืองมาเพิ่มมูลค่าโดยใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตบิวทานอลที่สามารถใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ โดยใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการเพื่อดูการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

2) เพื่อศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium* sp. เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ย่อยกากถั่วเหลืองที่เป็นวัสดุที่เหลือจากขั้นตอนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ด้วยการย่อยด้วยสารละลายกรด 2 ชนิดคือ กรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริกด้วยความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 นอร์มอล และนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ เพื่อหาสภาวะในการย่อยที่ดีที่สุดโดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ แล้วนำไปหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้จากห้องได้ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบความเป็นไปได้ในการผลิตบิวทานอลจากการใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

2) นำวัสดุที่เหลือจากขั้นตอนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่า

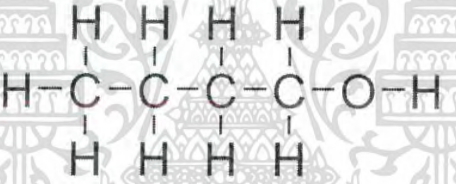
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 บิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no.71-36-3) เป็นที่รู้จักกันคือบิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) เป็นองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น $C_4H_9OH$ ดังรูปที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล บิวทานอลไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำ และสารเคมีอื่นๆที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกันคือเมทานอล (คาร์บอน 1คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Durre, 2008; Lee และคณะ 2008)



**รูปที่** 2.1 โครงสร้างของบิวทานอล
**ที่มา:** กฤศกา และคณะ (2553)

### 2.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล

จุลินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum C. saccharoperbutylicum* และ *C. beijerinckii* ซึ่งแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และสร้างเอนโดสปอร์ได้ ทำให้ทนความร้อนสูง และเมื่ออยู่ในรูปสปอร์จะสามารถทนออกซิเจนได้ดี การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น ทำได้โดยใช้เชื้อ *Clostridium* sp. เนื่องจากเชื้อนี้สามารถย่อยแป้งได้ แต่ในกรณีที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นจะนิยมใช้เชื้อ *C. saccharobutylicum* เพราะจะให้ผลผลิตดีกว่า (สมใจ, 2550)

### 2.1.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่าการหมักอะซิโตน – บิวทานอล - เอทานอล (acetone – butanol – ethanol, ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากสารชีวมวล ทั้งนี้ ABE fermentation เป็นกระบวนการที่รู้จักกันดีและเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สองซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจน จึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้ง *C. beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน (สุนทร และคณะ, 2555)

**2.1.3 ประโยชน์ของบิวทานอล**

นอกเหนือจากการใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butylacrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น โดยทั้งบิวทานอลและสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายได้อย่างดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทำ อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกเหนือจากที่ได้กล่าวไปแล้ว บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลิ่นรสได้อีกด้วย (สุนทร และคณะ, 2555)

**2.1.4 ชีวเคมีของกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล**

รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ดังได้กล่าวไปแล้วนั้น วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.2 ทั้งนี้ น้ำตาลในกลุ่ม Hexose ($C_6$) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMPP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ NADH + $H^+$ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาล Pentose ($C_5$) จะถูก metabolized ด้วย วิถี Pentose phosphate (Pentose phosplate pathway) เกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์และReduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ (Jone และ Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วย กำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง $NAD^+$ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง $NAD^+$ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenaseก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH + $H^+$ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง $NAD^+$ ด้วย (สุนทร และคณะ, 2555)

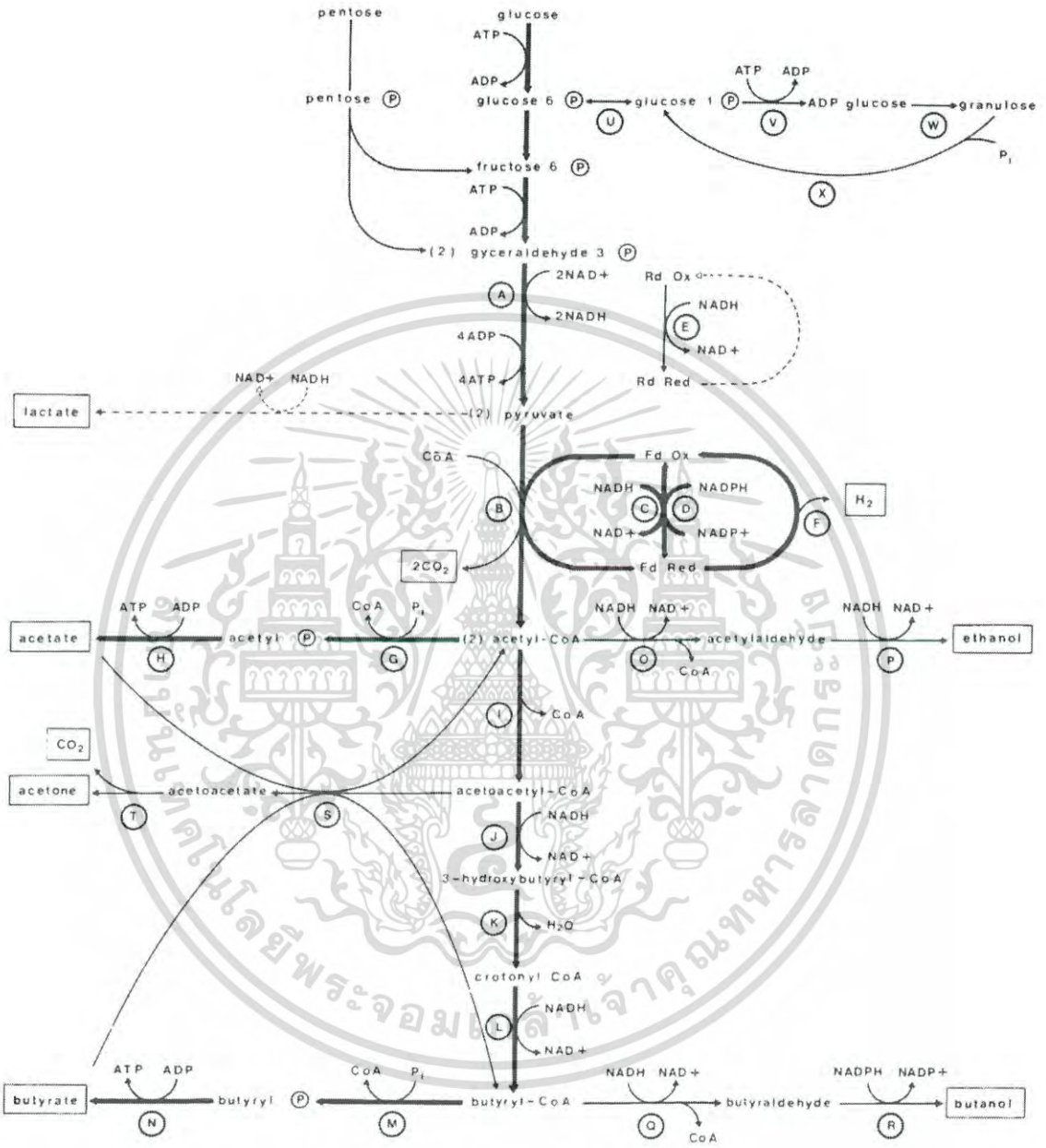
## 2.2 *Clostridium* sp.

### 2.2.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

*Clostridium* sp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้และเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ทั้งนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (Exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น *C. tetanus*, *C. botulum* เป็นต้น ในช่วงศตวรรษที่แบคทีเรีย Clostridia ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* และ *C. saccharoperbutylacetonium* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการ ABE fermentation โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตบิวทานอลและอะซิโตนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตนและเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ต่อมาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ถูกนำไปพัฒนาเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล จากแป้งและน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (Pentose) ได้ในอัตราส่วน 6:3:1 ตามลำดับ (วรภัทร์, 2554; สุนทร และคณะ, 2555; Al-Shorgani และคณะ, 2012)

*Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.6-0.9 x 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบๆ เซลล์ (สุนทร และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.2** วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

**ที่มา:** สุนทร และคณะ (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

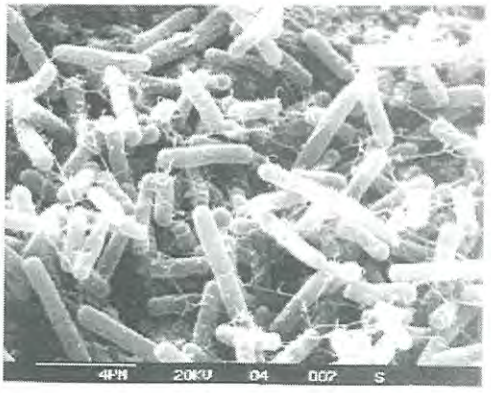
**หมายเหตุ** เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร:

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

*Clostridium acetobutylicum* มีอนุกรมวิธานดังนี้ (วรภัทร์, 2554)

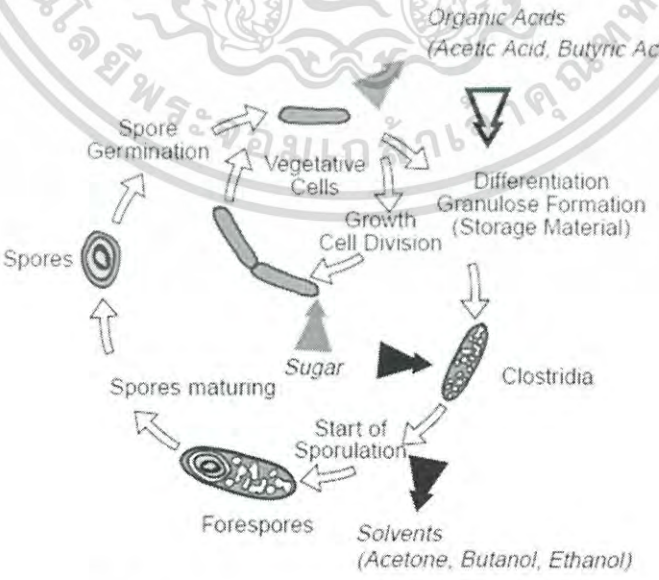
Kingdom: Bacteria
Division: Firmicutes
Class: Clostridia
Order: Clostridiale
Family: Clostridiaceae
Genus: *Clostridium*
Species: *C. acetobutylicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่** 2.3 ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
**ที่มา:** http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/10395 (6 มิถุนายน 2560)

วงจรชีวิตและการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.4 ได้แก่ (1) การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (Rods-shaped) ซึ่งอาจจะในในลักษณะที่เป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกัน เป็นสายโซ่ยาวก็ได้ (2) รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ (Cigar-shape) การเจริญในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้น (3) Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป (4) รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (สุนทร และคณะ, 2555)




**รูปที่** 2.4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*
**ที่มา:** สุนทร และคณะ (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Clostridium beijerinckii* มีอนุกรมวิธานดังนี้ (Keirs และคณะ, 2001)

Kingdom: Bacteria

Division: Firmicutes

Class: Clostridia

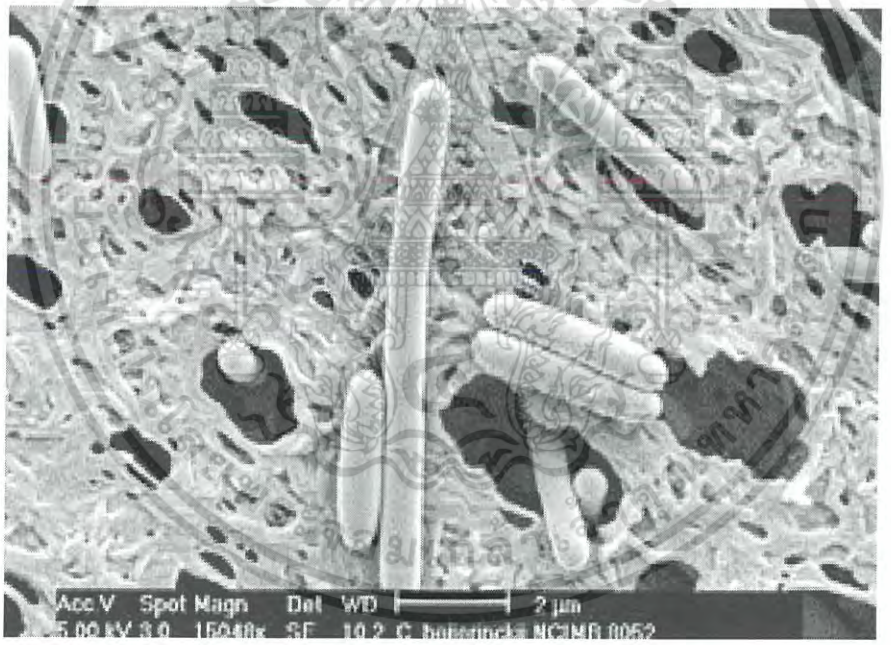
Order: Clostridiale

Family: Clostridiaceae

Genus: *Clostridium*

Species: *C. beijerinckii*

*Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อน ดังแสดงในรูปที่ 2.5 เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา มีการเจริญเติบโตโดยการสร้างสปอร์ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ (Noparat และคณะ, 2011; Zhao และคณะ, 2011; Wang และคณะ, 2015)




**รูปที่** 2.5 ลักษณะจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราดของเชื้อ *Clostridium beijerinckii*
**ที่มา:** http://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html (6 มิถุนายน 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Clostridium saccharoperbutylacetonium* มีอนุกรมวิธานดังนี้ (Keirs และคณะ, 2001)

Kingdom: Bacteria
Division: Firmicutes
Class: Clostridia
Order: Clostridiale
Family: Clostridiaceae
Genus: *Clostridium*
Species: *C. saccharoperbutylacetonium*

*Clostridium saccharoperbutylacetonium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม โดย *C. saccharoperbutylacetonium* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Alalayah และคณะ, 2008; Nasr และคณะ, 2017)

อุตสาหกรรมการผลิตบิวทานอลมีแนวโน้มที่จะผลิตมาจากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียแบบไม่มีออกซิเจนโดยใช้แบคทีเรียสกุลคลอสทริเดียม แบคทีเรียสกุลนี้เป็นสกุลที่รู้จักกันแพร่หลายและศึกษากันมาอย่างยาวนาน โดยมีการศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1912 เมื่อนักเคมีชาวอิสราเอล Chaim Weizmann ได้ทำการแยกจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และหมักโดยใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น พบว่าแบคทีเรีย สกุลนี้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนาและนำมาใช้เป็นอุตสาหกรรมการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE Fermentation) กันอย่างแพร่หลายในยุโรป ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้าที่ศึกษาค้นคว้าเป็นจำนวนมาก สิ่งที่แตกต่างกันคือ ชนิดของ *Clostridium* sp. ที่มีความสามารถในการ ใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกันและให้ผลผลิตความเข้มข้นของบิวทานอลที่แตกต่างกัน จุดเด่นของการใช้ *Clostridium* sp. ในการผลิตไบโอแอลกอฮอล์คือ แบคทีเรียสกุลนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) จึงมีความสามารถในการทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าจุลินทรีย์สกุลอื่น จึงอาจกล่าวได้ว่าไม่มีแบคทีเรียในสกุลใดในกลุ่ม Archea และ Eucarya ที่จะมีประสิทธิภาพตามธรรมชาติเพียงพอในการผลิตบิวทานอลได้ในระดับอุตสาหกรรมเท่า *Clostridium* sp. (จันทรัสม์ และคณะ, 2559)

## 2.3 ถั่วเหลือง

มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycin max* (L) Merr เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล *Leguminosae* วงศ์ย่อย *Papilionoideae* เผ่า *Phaseoleae* สกุล *Glycine Willd* สกุลย่อย *Soja* เป็นพืชตระกูลถั่ว มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Soja Bean หรือ Soybean และยังมีชื่อเรียกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ ถั่วพระ เหลือง, ถั่วแระ, ถั่วแม่ตาย, ถั่วเหลือง (ภาคกลาง), มะถั่วเน่า ภาคเหนือ), อึ่งตั่วเต่า, เฮ็กตั่วเต่า (จีน - แต้จิ๋ว), โซยา บีน (อังกฤษ), โซยุ (ญี่ปุ่น) (ภัคธีมา, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วเหลืองมีสารอาหารต่างๆซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน ทำให้ถั่วเหลืองมีคุณค่าทางอาหารและถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมาย ที่สำคัญ ถั่วเหลืองมีประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคที่สำคัญซึ่งมนุษย์กำลังเผชิญ ได้แก่ โรคหัวใจเส้นเลือดอุดตัน ความดันโลหิตสูง และมะเร็ง (อุทัย, 2543)

**รูปที่ 2.6** ถั่วเหลือง
**ที่มา:** http://www.tnamcot.com/content/146313 (6 มกราคม 2560)

ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและเป็นแหล่งของโปรตีนและไขมันที่มีคุณภาพ ในถั่วเหลืองมีปริมาณของสารอาหารในเมล็ดถั่วเหลืองโดยประมาณดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ 2.2 โปรตีนถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสุขภาพคนเราถึง 8 ชนิด คือ ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน ทริปโตเฟน และเวลีน มีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับโปรตีนจากสัตว์แต่ยังไม่เท่าเทียมกับโปรตีนจากนม ไข่ หรือเนื้อสัตว์ (ภัคธีมา, 2552)

**ตารางที่ 2.1** ส่วนประกอบของถั่วเหลืองโดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง

| ส่วนของถั่วเหลือง | โปรตีน (%) | ไขมัน (%) | คาร์โบไฮเดรต (%) | เถ้า (%) |
|---|---|---|---|---|
| **เมล็ดถั่วเหลือง** | 40 | 21 | 34 | 4.9 |
| **ใบเลี้ยง** | 43 | 23 | 29 | 5.0 |
| **เปลือก** | 9 | 1 | 86 | 4.3 |
| **ไฮโพทอคิล** | 41 | 11 | 43 | 4.4 |

**ที่มา:** ภัคธีมา (2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.2** ส่วนประกอบของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์

| ส่วนประกอบ | ถั่วเหลือง (% น้ำหนักแห้ง) | กากถั่วเหลือง | | กากถั่วเหลือง (Banaszkiewicz, 2000) (%) |
|---|---|---|---|---|
| | | 44% โปรตีนหยาบ (% น้ำหนักแห้ง) | 49% โปรตีนหยาบ (% น้ำหนักแห้ง) | |
| โปรตีนหยาบ | 37.08 | 43.8-49.9 | 52.8-56.3 | 44.40 |
| เถ้า | 4.86 | 5.6-7.2 | 5.2-9.1 | 6.65 |
| ไขมัน | 18.38 | 0.55-3.0 | 1.0-3.3 | 2.18 |
| เยื่อใยหยาบ | 5.12 | 4.3-7.2 | 3.1-4.1 | 6.75 |
| ส่วนประกอบของผนังเซลล์ | 12.98 | 12.3-18.9 | 7.4-12.2 | 15.51 |
| เซลลูโลส, ลิกนิน, คิวติน, เถ้าที่ไม่ละลายในกรด | 7.22 | 8.9-11.9 | 5.2-6.7 | 9.5 |
| คาร์โบไฮเดรต | 24.00 | 34.3 | 33.2 | 31.82 |
| แป้ง | 4.66 | 5.51 | 5.46 | 6.3 |

**ที่มา:** Banaszkiewicz (2011)

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Dong และคณะ (2015) ได้ทำการประเมินความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตบิวทานอลโดยกากถั่วเหลืองนี้จะมีส่วนประกอบหลักเป็นโปรตีนประมาณ 40% และคาร์โบไฮเดรต 30% โดยเชื้อ *C. beijerinckii* BA101 โดยเปรียบเทียบกับตัวความคุมที่เป็นอาหาร P2 ที่มีส่วนประกอบคือ กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียม-อะซิเตท 2.2 กรัมต่อลิตร บัฟเฟอร์และแร่ธาตุ ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นของกากถั่วเหลือง 5 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการสนับสนุนให้เชื้อดังกล่าวผลิตบิวทานอลจากกลูโคสได้ดี แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากถั่วเหลืองจะไม่มีผลต่อการเพิ่มของบิวทานอล และยังได้ผลที่คล้ายกันนี้ เมื่อทำการทดลองกับแหล่งคาร์บอนที่ผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส สามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัดที่มีราคาแพงในกระบวนการหมัก ABE โดยเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนได้อัตราการผลิต ABE เท่ากับ 8.9 กรัมต่อลิตร เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นลำต้นฝ้ายได้อัตราการผลิต ABE เท่ากับ 9.3 กรัมต่อลิตร เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นกากมันสำปะหลังได้อัตราการผลิต ABE เท่ากับ 10.0 กรัมต่อลิตร

Mechmecha และคณะ (2016) ได้ประเมินความเป็นไปได้ในการนำน้ำที่ได้จาก alfalfa ไปใช้แทนที่หรือใส่เพิ่มเติมในอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักผลิตอะซิโตน–บิวทานอล–เอทานอล (acetone–butanol–ethanol, ABE) ในงานวิจัยนี้ได้มีการเก็บเกี่ยวต้น alfalfa ในช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวแตกต่างกันโดยและแบ่งสามครั้งคือ เดือนมิถุนายน, กรกฎาคม และสิงหาคมแล้วนำทั้งสามครั้งที่เก็บเกี่ยวมา ไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบคุณสมบัติ หลังจากนั้นทำการเลือกครั้งที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคมที่เป็นครั้งดีที่สุดออกมา เพื่อนำไปใช้ในการในกระบวนการหมัก โดยเลือกช่วงที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคมเนื่องจากมีอัตราส่วนของ C:N และองค์ประกอบของสารอาหารในน้ำที่สกัดได้เหมาะสมที่สุด ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของการเสริมไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และการผลิตบิวทานอล Mechmecha และคณะได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่มีไซโลส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันและมีการใช้น้ำ alfalfa แทนที่ยีสต์สกัดหรือใส่เป็นอาหารเสริมไปในอาหารในสัดส่วนร้อยละ 10, 25 และ 50 โดยปริมาตร เมื่อใช้น้ำ alfalfa แทนยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.9 กรัมต่อลิตรนั้น มีการผลิตบิวทานอลความเข้มข้น 3.52 กรัมต่อลิตรซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตบิวทานอลที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ส่วนในอาหารที่มีการเสริมอาหารด้วยน้ำ alfalfa 10% นั้น น้ำ alfalfa ได้ไปกระตุ้นให้มีการผลิตบิวทานอลได้ความเข้มถึง 5 กรัมต่อลิตรโดยจากผลที่ได้แสดงว่า อัตราส่วนของ C:N ที่จะเพิ่มกระบวนการผลิตบิวทานอลควรอยู่ระหว่าง 21 และ 35 ซึ่งผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าน้ำ alfalfa เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพที่สามารถกระตุ้นกระบวนการผลิตบิวทานอลที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งจะได้บิวทานอลสูงสุดเท่ากับ 5.62 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำ alfalfa เสริมอาหาร 10% โดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pan และคณะ (2012) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้กากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ โปรตีน มาใส่เพิ่มเข้าไปในซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้ว เพื่อนำไปผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylium* CH012 โดยได้ทำการทดลองกับซังข้าวโพดที่ย่อยด้วยวิธีที่แตกต่างกันสองแบบ คือย่อยด้วยกรดและย่อยด้วยเอนไซม์และใส่กากถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันลงในอาหาร โดยกากถั่วเลืองที่ใส่จะผ่านการย่อยโดยนำไปผสมกับน้ำแล้วนำไปใส่ในหม้ออบความดัน แล้วถึงจะนำไปผสมกับซังข้าวโพดที่ถูกย่อยเพื่อนำไปเตรียมอาหารต่อไป ผลที่ได้ออกมาคือ ในซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยกรดมีตัวยับยั้งอยู่ ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้ จึงมีความเข้มข้นเพียง 6.61 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของอะซิโตนคือ 5.1 กรัมต่อลิตร และผลได้ของ ABE คือ 0.28 เมื่อใช้ซังข้าวโพดที่ย่อยด้วยเอมไซม์เซลลูเลส และมีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นอาหาร ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้ คือ 10.08 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของอะซิโตนคือ 5.53 กรัมต่อลิตร และผลได้ของ ABE คือ 0.30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

### 3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ ทำการถ่ายเชื้อและเก็บในกลีเซอรอลที่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน

### 3.1.2 สารเคมี

| | |
|---|---|
| กลูโคส | คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต |
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ | บิโตรเลียมอีเทอร์ |
| สารละลายกรดซัลฟิวริก | ไฮโดรคลอริก |
| อะซิโตน | กรดบอริกเข้มข้น |
| สารละลายฟีนอล์ทาลีน | ไซโลส |
| เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate) | เอทธิลแอลกอฮอล์ |
| อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) | ผงวุ้น (Agar) |
| เซลล์โลไบโอส | กลีเซอรอล |
| กรีนเมทธิลเรดอินดิเคเตอร์ | กรดซิตริก |
| Potassium hydrogenphthalate | กรดบิวทิริก |
| เอทานอล | บิวทานอล |
| กรดอะซิติก | มอลโตส |
| 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) | รีซาซูลิน (Resazurin) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.3 อุปกรณ์

| | |
|---|---|
| ขวดรูปชมพู่ | water bath |
| ปั๊มดูดอากาศ | ตู้อบลมร้อน |
| หม้อนึ่งอัดไอ | เครื่องโซนิเคเตอร์ |
| ถ้วยอะลูมิเนียม | กรวยกรองบุชเนอร์ |
| คีมหนีบ | กระดาษกรอง |
| Suction flask | บีกเกอร์ |
| แผ่นดูดออกซิเจน (Anaerocult A ®) | ลูกยางดูดสาร |
| Anaerobic jar | ปิเปต |
| ออโต้ปิเปตต์ | ตะแกรงร่อน |
| จานเพาะเลี้ยงเชื้อ | ตู้เย็น |
| แท่งแก้วคนสาร | ลูปเขี่ยเชื้อ |
| หลอดทดลองหลอดปั่นเหวี่ยง | เครื่องปั่นเหวี่ยง |
| เครื่องเขย่าสาร (Vortex) | ถังแก๊สไนโตรเจนและแก๊สผสม |
| ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) | กระบอกตวง |
| ขวดปรับปริมาตร | ช้อนตักสาร |
| กระดาษวัดพีเอช | เครื่องชั่งสาร |
| น้ำกลั่น | จุกสำลี |

ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber)

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM, MERCK)

ในส่วนผสมของอาหาร 38 กรัม มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อน้ำ 1 ลิตร ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| เปปโตน (Peptone) | 10 | กรัมต่อลิตร |
| อาหารสกัด (Beef extract) | 10 | กรัมต่อลิตร |
| ยีสต์สกัด (yeast extract) | 3 | กรัมต่อลิตร |
| เดกซ์โทรส (Dextrose) | 5 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 5 | กรัมต่อลิตร |
| โซเดียมอะซิเตท ($CH_3COONa$) | 3 | กรัมต่อลิตร |
| แป้งละลายน้ำ (Soluble starch) | 1 | กรัมต่อลิตร |
| ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride) | 0.5 | กรัมต่อลิตร |
| วุ้น (Agar) | 0.5 | กรัมต่อลิตร |

นำส่วนประกอบมาละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3.2.2 อาหาร T6

ดัดแปลงจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata และคณะ (1973) โดยมีส่วนประกอบดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ทริปโตน (Tryptone) | 6.00 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) | 2.00 | กรัมต่อลิตร |
| ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส ($K_2HPO_4$) | 0.50 | กรัมต่อลิตร |
| $MgSO_4 7H_2O$ | 0.30 | กรัมต่อลิตร |
| $FeSO_4 7H_2O$ | 0.01 | กรัมต่อลิตร |
| แอมโมเนียมอะซิเตต | 3.00 | กรัมต่อลิตร |
| Cysteine hydrochloride | 0.50 | กรัมต่อลิตร |
| น้ำตาลกลูโคส (Glucose) | 50.0 | กรัมต่อลิตร |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย NaOH พร้อมกับปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจะโดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลกลูโคสแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ ส่วนอาหารชุดทดลองทำการเตรียมโดยใช้ส่วนใสที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดในสภาวะที่เหมาะจากหัวข้อ 3.4 มาเติมองค์ประกอบของอาหาร T6 ยกเว้นยีสต์สกัดและทริปโตน ให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ 5 กรัมต่อลิตร และเติมสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

## 3.3 กากถั่วเหลือง

ได้รับความอนุเคราะห์กากถั่วเหลืองจาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ถนนพระสมุทรเจดีย์ ตำบลปากคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ นำกากถั่วเหลืองไปบดโดยไม่แยกขนาดแล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง และนำไปศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

## 3.4 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรด

### 3.4.1 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอ โดยหม้อนึ่งอัดไอใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน คือ 10, 20 และ 30 นาที ตัวอย่างที่ย่อยแล้วไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman™ เบอร์ 1 แล้วนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5 Dintrosalicylic acid) และวิเคราะห์หาโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method)

### 3.4.2 การย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก

นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอ โดยหม้อนึ่งอัดไอใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน 10, 20 และ 30 นาที ตัวอย่างที่ย่อยแล้วไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman™ เบอร์ 1 แล้วนำไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5 Dintrosalicylic acid) และวิเคราะห์หาโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

### 3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อโดยทำการถ่ายเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการและเก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง Reinforced Clostridium บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยนำไปทำการบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร RCM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร T6 ที่เตรียมไว้โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตรในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตรนำไปทำการบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ

### 3.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.5.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร T6 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบกับน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากกากถั่วเหลืองที่ได้จากขั้นตอนการย่อยให้เหมาะสมในหัวข้อ 3.4 โดยเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อปรับให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ120 แยกใส่หลอดเซนตริฟิวนำไปวัดความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Clean รุ่น PH500 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) โปรตีนที่ละลายน้ำได้และปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง Hight Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยนำไปเทียบกับชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เสร็จแล้วเติมอาหาร T6 ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรโดยเติมอาหารใส่ลงในขวดรูปชมพู่ทั้ง 3 ซ้ำ เพื่อปรับให้ปริมาตรอาหารมีค่าเท่าเดิม

## 3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

### 3.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate analysis)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

นำถ้วยอบที่มีตัวอย่างกากถั่วเหลืองอยู่ 1 กรัม ใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำออกใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 2 กรัม ใส่ในถ้วยอบ บันทึกน้ำหนัก ปิดฝาถ้วย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ ขณะอบเปิดฝาถ้วยออก เมื่อครบกำหนดเวลานำถ้วยออกใส่ในโถดูดความชื้นและปิดฝาถ้วยแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนัก

**การคำนวณ**

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

$W_1$ คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

$W_2$ คือ น้ำหนักถ้วยอบ + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

$W_3$ คือ น้ำหนักตัวอย่าง

**3.6.1.2 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)**

**การย่อยตัวอย่าง**

ชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลืองมา 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) เติมคะตะลิสต์ลงไป 1 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป 20-25 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shild สวม exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอดย่อย ตั้ง stand หลอดย่อยและ exhaust ลงบนเครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส ย่อยในตู้ดูดควันทำการย่อยจนสารละลายใสมีสีเขียวอ่อนหรือฟ้า ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออกปล่อยให้เย็นเพื่อรอนำไปกลั่น

**การกลั่น**

เปิด Power เครื่องหล่อเย็น จากนั้นเปิดเครื่องกลั่นแล้วตั้งระบบการทำงานของเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยน้ำกลั่น ตวงสารละลายบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ นำหลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นและวางขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกไว้บริเวณ Plateform ให้แท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก ปิด safty door ทำการกลั่นเป็นเวลา 4 นาที เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่และหลอดย่อยออกจากเครื่อง

**ขั้นตอนการไตเตรต**

นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติซึ่งเป็นสารละลายสีชมพูอ่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้**

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

%โปรตีน = % ไนโตรเจน x 6.25 (conversion factor)

**3.6.1.3 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)**

นำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลืองมา 2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิ้ล เปิดเครื่องสกัดและเครื่องทำความเย็นนำทิมเบิ้ลที่มีตัวอย่างวางลงในที่ใส่ทิมเบิ้ล จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ในฟลาสก์สกัดไขมันที่เหลือใส่บีกเกอร์ที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เพื่อระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์เหลือแต่ไขมันที่สกัดได้ นำออกมาใส่โถดูดความชื้นรอจนเย็นจากนั้น นำบีกเกอร์ไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำไปคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

**คำนวณ**

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

$W_1$ คือ น้ำหนักตัวอย่าง

$W_2$ คือ น้ำหนักบีกเกอร์

$W_3$ คือ น้ำหนักบีกเกอร์ + น้ำหนักไขมัน

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

นำครูซิเบิ้ลแก้วสำหรับวิเคราะห์เยื่อใยไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ผ่านการวิเคราะห์ความชื้นและสกัดไขมันแล้วใส่ลงไปในครูซิเบิ้ลที่ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก ประมาณ 1 กรัม วางครูซิเบิ้ลแก้วลงในหลุมที่อยู่บนตัวเครื่องสกัดเส้นใย เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้วเทลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายออก (เปิดลิ้นไปที่ vacuum) ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร (ในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดลิ้นไปที่ pressureเพื่อให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้วทำให้ส่วนผสมของถ้วยแก้วคลุกเคล้ากันโดยตลอด) เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนลงไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายด่างออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยอะซิโตนอีกทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 225 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำกากที่ได้ไปอบต่ออุณหภูมิ 500-550 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

**การคำนวณ**

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

$F_1$ = น้ำหนักของเยื่อใยหยาบรวมกับน้ำหนักเถ้า

$F_2$ = น้ำหนักที่ได้จะเป็นน้ำหนักเถ้า

$F_3$ = น้ำหนักตัวอย่าง

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

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์เยื่อใยหยาบแล้ว นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รออุณหภูมิลดจนเหลือต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้ถ้วยสัมผัสกับอากาศเย็นกะทันหันซึ่งอาจทำให้ถ้วยแตกได้ นำครูซิเบิ้ลออกใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นนำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก แล้วคำนวณตามสมการ

**การคำนวณ**

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

**3.6.2 การวิเคราะห์ทางเคมี**

**3.6.2.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจากวิธีของ Miller และคณะ, 1959)**

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและตัวอย่างที่เก็บจากการเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละการเจือจางมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสม ให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งเตรียมโดยวิธีดังต่อไปนี้

เตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยนำสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใช้สารละลายน้ำตาล ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.6.2.2 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method)(ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)**

นำตัวอย่างที่ทำการย่อยแล้วและตัวอย่างที่เก็บจากการเลี้ยงเชื้อ ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 10 นาทีหรือนานกว่านั้น แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรโดยให้ใส่อย่างรวดเร็วและผสมให้เข้ากันภายในหนึ่งถึงสองนาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วทำการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของตัวอย่างที่วัดได้จากกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

เตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย bovine serum albumin (BSA) โดยละลาย BSA ในระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลาย BSA ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 10 นาทีหรือนานกว่านั้น แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอลปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร โดยให้ใส่อย่างรวดเร็วและผสมให้เข้ากันภายในหนึ่งถึงสองนาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

**3.6.2.3 น้ำหนักชีวมวลแห้ง**

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดและนำตัวอย่างมาปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมลงไปและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

**การคำนวณ**

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ-น้ำหนักหลังอบ})}{3} \times 100$$

**3.6.2.4 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังโดยใช้เครื่อง HPLC**

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากหัวข้อ 3.4 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้กลีเซอรอลร้อยละ 5 สำหรับเป็น Internal standard แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตรความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM อัตราการไหล 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

**3.6.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลและสารอินทรีย์อื่นๆ**

นำส่วนใสของตัวอย่างจากข้อ 3.6 ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 7500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำมาเจือจางด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก โดยใช้เครื่อง HPLC โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจางเป็น 10 เท่า โดยใช้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดแลคติก กรดอะซิตริก และกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่างๆ โดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน

**3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ทุกการทดลองทำอย่างต่ำ 3 ซ้ำและนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 23) วิเคราะห์ตาราง ANOVA และค่าความแปรปรวนที่ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ $p < 0.05$ เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีของ LSD และใช้วิธีของ Duncan ในการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการวิจัยและอภิปลายผล

จากการศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองเพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 และ 0.02 นอร์มอล แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสด้วยเวลาที่แตกต่างกัน เลือกนำตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนดีที่สุดไปใช้แทนที่น้ำตาลและโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรและโปรตีน 5 กรัมต่อลิตรเป็นชุดความคุม

## 4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบถั่วเหลือง

จากการวิเคราะห์องค์ทางเคมีประกอบของถั่วเหลือง พบว่ากากถั่วเหลืองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุดคือ ร้อยละ 47.6 องค์ประกอบที่มีรองลงมาคือ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 28.44 ต่อมาคือ เถ้า ร้อยละ 6.94, เยื่อใยหยาบ ร้อยละ 6.33 และไขมันร้อยละ 0.51 ดังที่แสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** องค์ประกอบของกากถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง

| องค์ประกอบ | ร้อยละ (โดยน้ำหนักของกากถั่วเหลือง) |
|---|---|
| ความชื้น | 10.18 |
| โปรตีน | 47.60 |
| ไขมัน | 0.51 |
| เยื่อใยหยาบ | 6.33 |
| เถ้า | 6.94 |
| คาร์โบไฮเดรต | 28.44 |

เมื่อเปรียบเทียบกับค่าโปรตีนของกากถั่วเหลืองจาก Banaszkiewicz (2011) ที่ได้เท่ากับร้อยละ 43.8-49.9 ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกันกับในตารางที่ 4.1 คือ ร้อยละ 47.60 และได้ปริมาณเถ้าและเยื่อใยหยาบใกล้เคียงกับผลการทดลองเช่นกัน นอกจากนี้ Banaszkiewicz ได้ปริมาณเถ้าเท่ากับร้อยละ 5.6-7.2 และได้ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 4.3-7.2 ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ได้ปริมาณเถ้าร้อยละ 6.94 และได้ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 6.33 นอกจากนี้ผลที่ได้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dong และคณะ (2014) ที่ระบุบว่าปริมาณโปรตีนของกากถั่วเหลืองจะต้องมีมากกว่าร้อยละ 40 และกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูงอุดมไปด้วยกรดอะมิโน เช่น ไลซีน เมไธโอนีน ซีสเทอีน และกรดอะมิโนอื่นๆจึงจัดว่าเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบรูณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การย่อยกากถั่วเหลืองให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงที่สุด

นำกากถั่วเหลืองไปบดให้ละเอียดแล้วนำไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 และ 0.02 นอร์มอล แล้วนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกันคือ 10, 20 และ30 นาที เพื่อเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนมากที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ต่อไป

ผลที่ได้จากนำตัวอย่างกากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 นอร์มอล โดยใช้อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน คือ 10, 20 และ 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และ หาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ได้ผลในตารางที่ 4.2 4.3 และรูปที่ 4.1, 4.2, 4.3 และ 4.4

จากตารางที่ 4.2 ย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดไฮโดรคลอริก ให้ผลน้ำตาลมากสุดเท่ากับ 13.116 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอลให้ความร้อน 20 นาที รองลงมาคือที่ความเข้มข้นเดียวกัน (0.1 นอร์มอล) แต่ให้ความร้อน 10 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล 11.900 กรัมต่อลิตรลำดับที่สามคือ 0.08 นอร์มอลให้ความร้อน 20 นาที ได้ปริมาณน้ำตาล 10.483 กรัมต่อลิตร ย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก ให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มากสุดเท่ากับ 14.008 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นกรด 0.1 นอร์มอล และให้ความร้อน 20 นาที รองลงมาคือที่ความเข้มข้นเดียวกัน (0.1 นอร์มอล) ให้ความร้อน 30 นาที ได้ 7.717 กรัมต่อลิตรและ ลำดับที่สามที่ความเข้มข้นเดียวกัน (0.1 นอร์มอล) แต่ให้ความร้อน 10 นาที ได้ค่าเท่ากับ 7.636 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ 0.1 นอร์มอล และให้ความร้อน 20 และ 30 นาที ได้ปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 24.450 และ 24.587 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่กรดความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และให้ความร้อน 10 นาทีให้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 19.473 กรัมต่อลิตร ส่วนกรดซัลฟิวริก ให้ปริมาณโปรตีนมากสุดเท่ากับ 13.714 กรัมต่อลิตร ที่ 0.1 นอร์มอลและให้ความร้อน 30 นาที และที่ความเข้มข้น 0.1นอร์มอล ให้ความร้อน 10 และ 20 นาที ให้ผลใกล้เคียงกัน เท่ากับ 11.681 และ 11.470 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟิวริก พบว่าย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดไฮโดรคลอริกให้ปริมาณน้ำตาลและโปรตีนมากกว่าการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก โดยความเข้มข้นและเวลาที่ให้ความร้อน ที่ให้ค่าสูงสุด ที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 20 นาที

จากตารางที่ 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนด้วยเครื่องหม้อนึ่งอัดไอใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที ให้ผลดีใกล้เคียงการให้ความร้อน 30 นาทีในทุกความเข้มข้นของทั้งกรดซัลฟิวริกและกรดไฮโดรคลอริกแสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนเป็นระยะเวลา 30 นาที ส่งผลต่อการย่อยของกรดทั้งสองชนิดปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$p > 0.05$ ในส่วนของความเข้มข้นของกรดทั้งสองชนิดนั้นความเข้มข้นที่สามารถย่อยกากถั่วเหลืองได้ดีที่สุดคือ 0.1 นอร์มอล ในการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกสามารถย่อยโปรตีนได้ความเข้มข้นมากที่เวลา 30 นาที ได้มากถึง 24.587 กรัมต่อลิตรและได้ความเข้มข้นน้ำตาลมากที่สุดถึง 13.116 กรัมต่อลิตรที่เวลา 20 นาที ส่วนการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกมีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลและโปรตีนมากที่สุดที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เช่นกันโดยได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 14.008 กรัมต่อลิตรที่เวลา 20 นาทีและได้ความเข้มข้นโปรตีนมากที่สุด คือ 13.714 กรัมต่อลิตรที่เวลา 30 นาที แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดที่มากขึ้นอาจจะมีผลต่อการย่อยกากถั่วเหลืองของกรด เมื่อดูจากตารางที่ 4.2 และ 4.3 จะเห็นว่าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกได้ปริมาณมากกว่ากรดซัลฟิวริกในทุกเวลาและทุกความเข้มข้นแสดงว่ากรดไฮโดรคลอริกสามารถย่อยกากถั่วเหลืองได้ดีกว่ากรดซัลฟิวริก จากงานวิจัยของ จิรนาถ (2549) กล่าวไว้ว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดนั้นพันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยได้เร็วกว่าพันธะเปบไทด์อื่นๆ นอกจากนี้การย่อยด้งกรดจะทำให้กรดอะมิโนที่มีกำมะถันและหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบถูกทำลาย และจากงานวิจัยของลีนา (2556) กล่าวว่าโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและซัลฟิวริก จะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลางประกอบอยู่ โดยเมื่อใช้กรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์และถ้าใช้กรดซัลฟิวริกจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟตในอุตสาหกรรมที่มีการย่อยสลายโปรตีนส่วนใหญ่นิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกเนื่องจากเกลือที่เกิดในกระบวนการย่อยคือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งไม่ส่งผลต่อผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกด้วยความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

| ความเข้มข้น (นอร์มอล) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | กรดไฮโดรคลอริก | | | กรดซัลฟิวริก | | |
| | 10 นาที | 20 นาที | 30 นาที | 10 นาที | 20 นาที | 30 นาที |
| 0.02 | 2.778±0.645 | 1.317±0.484 | 1.694±0.213 | 0.688±0.023 | 1.181±0.074 | 1.380±0.108 |
| 0.04 | 3.236±0.211 | 4.044±0.323 | 4.484±0.469 | 1.740±0.1378 | 1.550±0.454 | 2.079±0.025 |
| 0.06 | 5.957±0.860 | 6.875±0.395 | 8.536±0.827 | 2.897±0.180 | 3.562±0.158 | 3.802±0.327 |
| 0.08 | 7.984±0.660 | 10.483±0.706 | 9.811±0.706 | 5.438±0.506 | 4.686±0.748 | 0.918±0.021 |
| 0.1 | 11.900±0.200 | 13.116±1.087 | 8.416±1.118 | 7.636±0.200 | 14.008±1.087 | 7.717±1.118 |

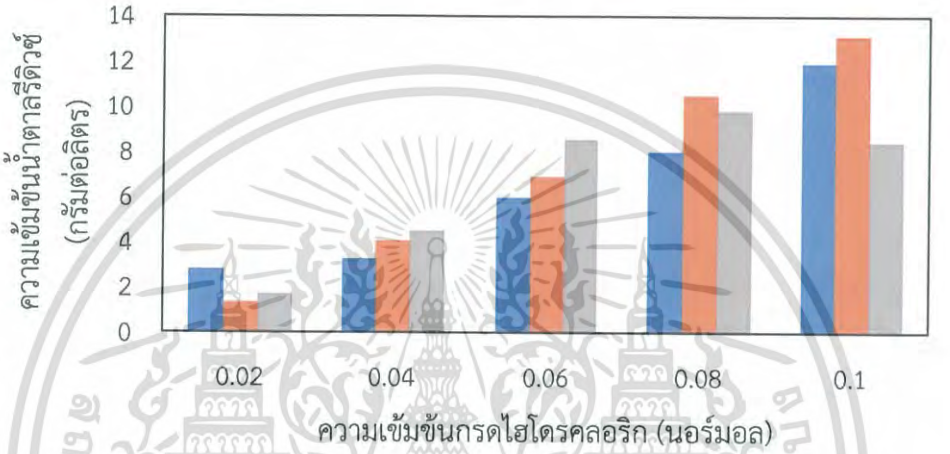
**ตารางที่ 4.3** ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry – Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริกด้วยความความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

| ความเข้มข้น (นอร์มอล) | ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (กรัมต่อลิตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | กรดไฮโดรคลอริก | | | กรดซัลฟิวริก | | |
| | 10 นาที | 20 นาที | 30 นาที | 10 นาที | 20 นาที | 30 นาที |
| 0.02 | 6.876±0.199 | 9.941±1.281 | 7.102±0.498 | 7.969±0.363 | 1.493±0.091 | 6.146±0.420 |
| 0.04 | 6.421±0.297 | 9.207±0.566 | 7.366±0.330 | 6.068±0.511 | 7.941±0.697 | 6.345±0.887 |
| 0.06 | 7.664±0.214 | 10.169±0.241 | 12.608±0.932 | 6.901±0.546 | 4.492±0.151 | 6.397±0.549 |
| 0.08 | 11.267±1.327 | 16.962±0.666 | 15.297±0.704 | 8.788±0.913 | 10.725±1.173 | 7.042±1.358 |
| 0.1 | 19.473±2.304 | 24.450±2.211 | 24.587±1.259 | 11.681±0.480 | 11.470±0.324 | 13.714±0.654 |

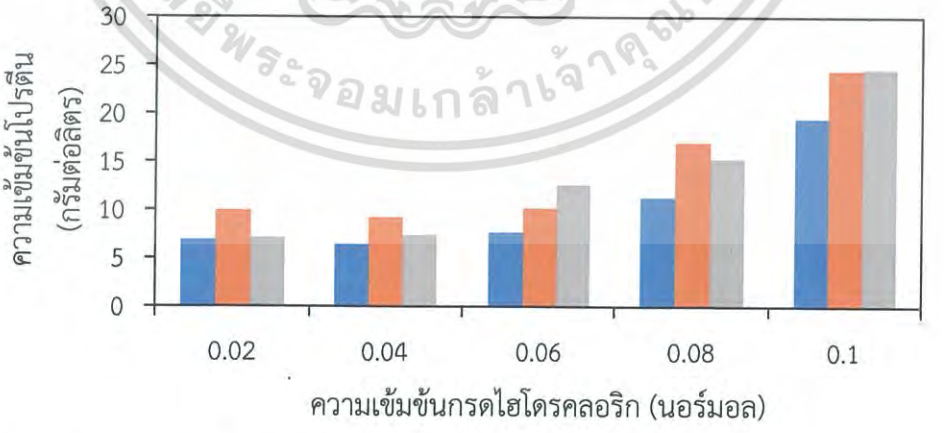
**ตารางที่ 4.4** ตาราง ANOVA ของการเปรียบเทียบชนิดกรด ความเข้มข้น และระยะเวลาการให้ความร้อน ที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีน

| แหล่ง | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 3891.017[a] | 29 | 134.173 | 322.372 | .000 |
| Intercept | 7671.656 | 1 | 7671.656 | 18432.369 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น*เวลา | 156.541 | 8 | 19.568 | 47.014 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น | 213.645 | 4 | 53.411 | 128.329 | .000 |
| ความเข้มข้น*เวลา | 288.036 | 8 | 36.004 | 86.506 | .000 |
| กรด*เวลา | 17.421 | 2 | 8.711 | 20.929 | .000 |
| กรด | 512.875 | 1 | 512.875 | 1232.263 | .000 |
| ความเข้มข้น | 2625.337 | 4 | 656.334 | 1576.947 | .000 |
| เวลา | 77.163 | 2 | 38.581 | 92.698 | .000 |
| ความคลาดเคลื่อน | 99.889 | 240 | .416 | | |
| ทั้งหมด | 11662.562 | 270 | | | |
| Corrected Total | 3990.906 | 269 | | | |

จากตารางที่ 4.4 แสดงอิทธิพลเดี่ยวและอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสามได้แก่ ชนิดกรด ความเข้มข้น และเวลาที่ให้ความร้อน โดยอิทธิพลเดี่ยวของ ชนิดกรด ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ให้ความร้อนมีค่า $p < 0.05$ แสดงให้เห็นว่าทุกปัจจัยมีอิทธิพลเดี่ยวส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อิทธิพลร่วมระหว่างสองปัจจัยได้แก่ กรดกับเวลา ความเข้มข้นกับเวลา และ กรดกับความเข้มข้นมีค่า $p < 0.05$ แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลร่วมสองปัจจัยส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่ละลายน้ำได้ให้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อิทธิพลร่วมระหว่างสามปัจจัย ได้แก่ กรด ความเข้มข้น และเวลา พบว่ามีค่า $p < 0.05$ แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลร่วมสามปัจจัยส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลและโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

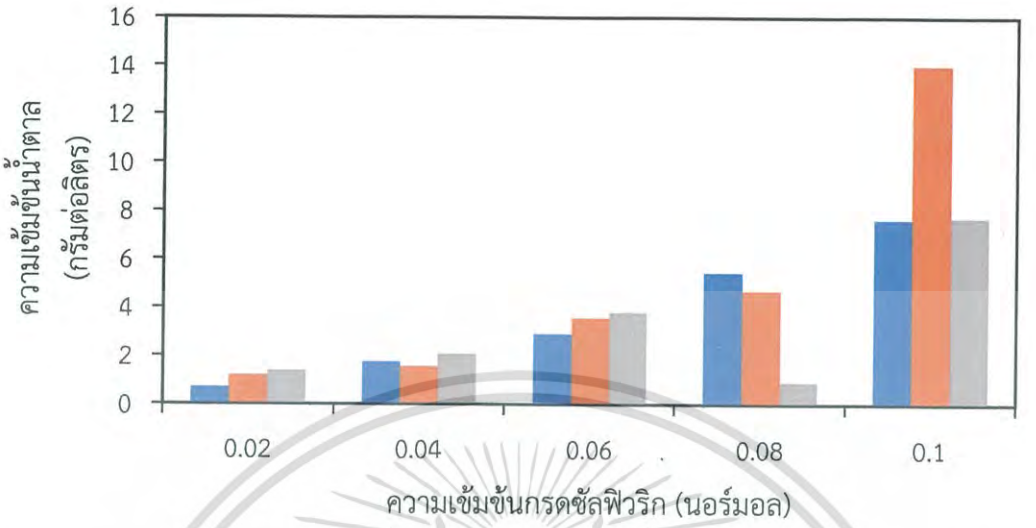



**รูปที่ 4.1** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ( 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที )

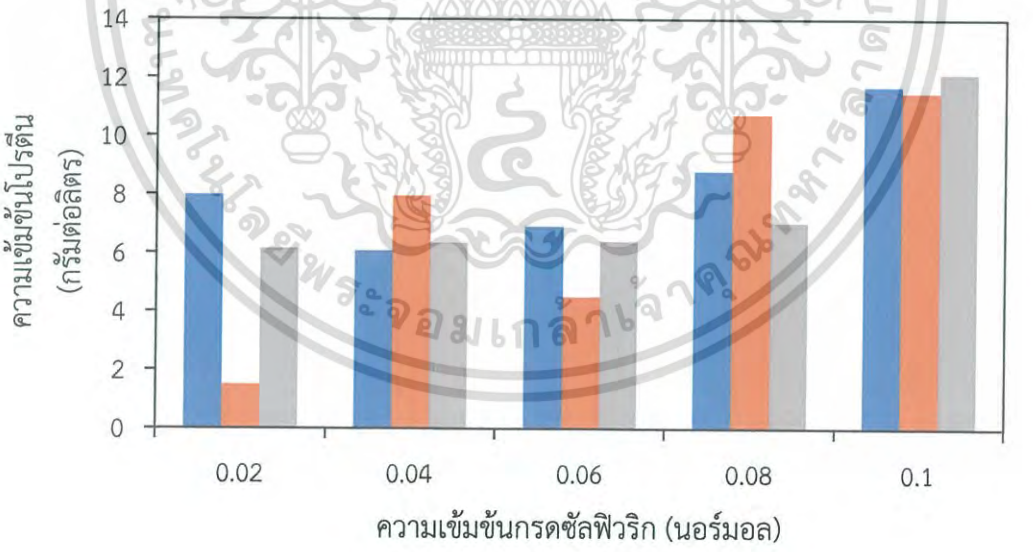



**รูปที่ 4.2** ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ( 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.3** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ( 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที )




**รูปที่ 4.4** ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) ในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02-0.1 นอร์มอล และให้ความร้อนเป็นเวลา 10-30 นาที ในหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ( 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.2.1 ชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยกรด**

ทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่พบในกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอลแล้ว โดยทำการเจือจางส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็น Internal standard ได้ผลดังตารางที่ 4.5 ทำให้ทราบว่าหลังจากทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอลแล้วพบน้ำตาลรีดิวซ์ 3 ชนิด คือ กลูโคสได้เท่ากับ 3.93 กรัมต่อลิตร มอลโตส 1.37 กรัมต่อลิตรและไซโลส 8.05 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบน้ำตาลเซลโลไบโอส

**ตารางที่ 4.5** ชนิดน้ำตาลที่วิเคราะห์ที่ได้จากตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก

| ชนิดน้ำตาล | ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|
| กลูโคส | $3.93^{b} \pm 0.03$ |
| มอลโตส | $1.37^{c} \pm 0.00$ |
| ไซโลส | $8.05^{a} \pm 0.05$ |
| เซลโลไบโอส | - |

หมายเหตุ: a,b และ c ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือคือเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.5 พบว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก พบน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบคือ กลูโคสและไซโลส และน้ำตาลโมเลกุลคู่คือ มอลโตส แต่ไม่พบน้ำตาลเซลโลไบโอสซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Banaszkiewicz (2011) ที่กล่าวว่า องค์ประกอบส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ของถั่วเหลืองจะเป็นเฮมิเซลลูโลส และ Herrerat และคณะ (2003) กล่าวว่า กรดที่ถูกเจือจางจะเกิดการย่อยแบบจำกัดที่เรียกว่า พรีไฮโดรไลซิสที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้แต่จะไม่มีผลต่อเซลลูโลสและลิกนินมากนัก ส่วนกลูโคสได้จากการย่อยองค์ประกอบที่เป็นแป้งของกากถั่วเหลือง

## 4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

หลังจากที่ทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดไฮโดรคลอริกและซัลฟิวริกด้วยความเข้มข้นและเวลาของการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่แตกต่างกันแล้วนำส่วนใสที่กรองได้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS แลวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีลอว์รี-ฟอลิน (Lowry-Folin method) ได้ทำการเลือกกากถั่วเหลืองที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เวลา 20 นาทีมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนยีสต์สกัดกับทริปโตนและใช้รวมกับแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเจือจางส่วนใสที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเท่ากับในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 และทำการวัดน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แล้วทำการปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ที่ใช้เป็นชุดควบคุม แล้วนำไปหมักโดยหัวเชื้อ *Clostridium* sp. ร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยทำการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเติมอาหารลงไปเท่ากับปริมาตรตัวอย่างที่เก็บ ตัวอย่างที่เก็บจะถูกนำไปวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter และนำไปปั่นเหวี่ยง 7,500 rpm 20 นาที และเก็บส่วนใสเพื่อไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ส่วนตะกอนนำไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium sp.* ด้วยอาหารชุดควบคุม ในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 47.59 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลงถึงระยะสุดท้ายของการหมักที่ชั่วโมง 120 ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.01 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกันกับผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารชุดทดลองจากตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6 ที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 47.00 กรัมต่อลิตรและลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะสุดท้ายของการหมัก

ส่วนปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าในอาหารทั้งสองชนิดนั้นมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคงที่โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ อาจเป็นเพราะเชื้อใช้โปรตีนในปริมาณน้อยแต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยของ Mechmech และคณะ (2015) ได้กล่าวว่าถ้าไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนอย่างลงในอาหาร เชื้อ *Clostridium* จะสามารถผลิตสารละลายอินทรีย์ได้ในปริมาณที่น้อย โดย Kasab (2002) รายงานว่าเชื้อ *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 สามารถเจริญเติบโตได้และผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีขึ้นเมื่อเติมยีสต์สกัดและทริปโตนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นเพราะว่ากรดอะมิโนสามารถทำให้การเมทาบอไลท์ของเชื้อดีขึ้น

จากตารางที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้งของอาหาร T6 ชุดควบคุมชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 0.2633 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและมีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 เท่ากับ 2.5633 กรัมต่อลิตร ส่วนในชุดทดลอง ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเท่ากับ 0.5633 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 38 เพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.2433 กรัมต่อลิตร

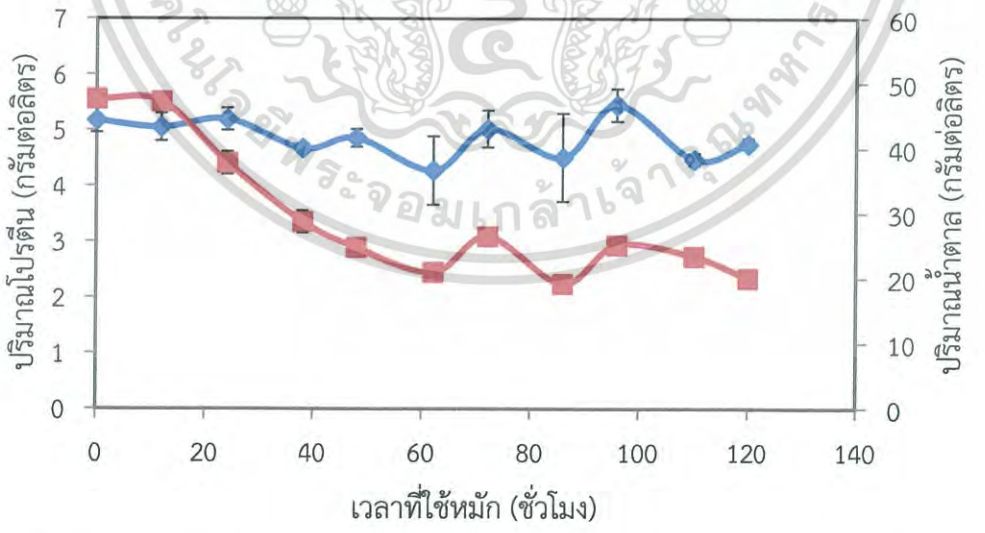
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณปริมาณน้ำตาลกับโปรตีนและน้ำหนักเซลล์แห้งในชุดควบคุมพบว่าจากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 และ 4.7 แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างที่เก็บจากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมพบว่าในชั่วโมงที่ 0 ถึง 48 ปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และในชั่วโมงต่อมาที่ 62 ถึง 120 พบว่าปริมาณน้ำตาลและเซลล์ที่ได้มีแนวโน้มคงที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p > 0.05$ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่พบมากสุดอยู่ที่ช่วงเวลาสุดท้ายของการหมักชั่วโมงที่ 120 ชั่วโมง คือ 2.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งสัมพันธ์กับน้ำตาลที่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และจากรูปที่ 4.6 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้สัมพันธ์กันโดยน้ำตาลลดลงในขณะที่ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักโดยช่วงเวลาที่พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดคือชั่วโมงที่ 120 คือ 3.24 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกับชุดควบคุม ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมีแนวโน้มคงที่ทั้งสองรูปแบบการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.6** ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน

| เวลา (ชั่วโมง) | พีเอช | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | $5.62^{efg}$ ±0.04 | $0.26^{c}$ ±0.10 | $47.60^{a}$ ±1.07 | $5.17^{ab}$ ±0.22 |
| 14 | $5.25^{g}$ ±0.03 | $1.14^{b}$ ±0.13 | $47.21^{a}$ ±1.01 | $5.05^{abc}$ ±0.25 |
| 24 | $5.45^{fg}$ ±0.19 | $1.44^{b}$ ±0.19 | $37.79^{b}$ ±1.74 | $5.19^{ab}$ ±0.20 |
| 38 | $6.29^{abc}$ ±0.19 | $1.35^{b}$ ±0.57 | $28.74^{c}$ ±1.71 | $4.67^{bcd}$ ±0.08 |
| 48 | $6.43^{ab}$ ±0.13 | $1.55^{b}$ ±0.43 | $24.79^{de}$ ±0.38 | $4.86^{abcd}$ ±0.16 |
| 62 | $6.57^{a}$ ±0.13 | $1.01^{b}$ ±0.14 | $20.96^{f}$ ±0.29 | $4.27^{d}$ ±0.61 |
| 72 | $6.07^{bcd}$ ±0.00 | $1.22^{b}$ ±0.22 | $26.49^{d}$ ±0.89 | $5.02^{abc}$ ±0.30 |
| 86 | $6.12^{bcd}$ ±0.38 | $1.34^{b}$ ±0.07 | $19.19^{f}$ ±1.43 | $4.50^{bcd}$ ±0.79 |
| 96 | $6.28^{abc}$ ±0.20 | $1.16^{b}$ ±0.22 | $25.18^{de}$ ±0.64 | $5.45^{a}$ ±0.29 |
| 110 | $5.95^{cde}$ ±0.37 | $1.15^{b}$ ±0.14 | $23.40^{e}$ ±1.14 | $4.47^{cd}$ ±0.11 |
| 120 | $5.80^{dfg}$ ±0.40 | $2.56^{a}$ ±0.39 | $20.01^{f}$ ±0.25 | $4.75^{bcd}$ ±0.09 |

**หมายเหตุ** a b c d e f และ g ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



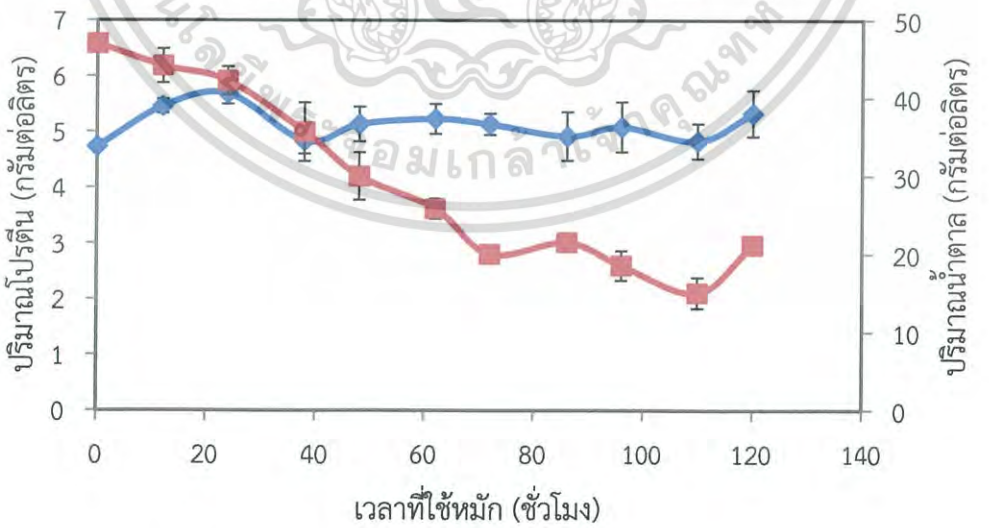

**รูปที่ 4.5** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (■ คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ , ◆ คือปริมาณโปรตีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.7** ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง

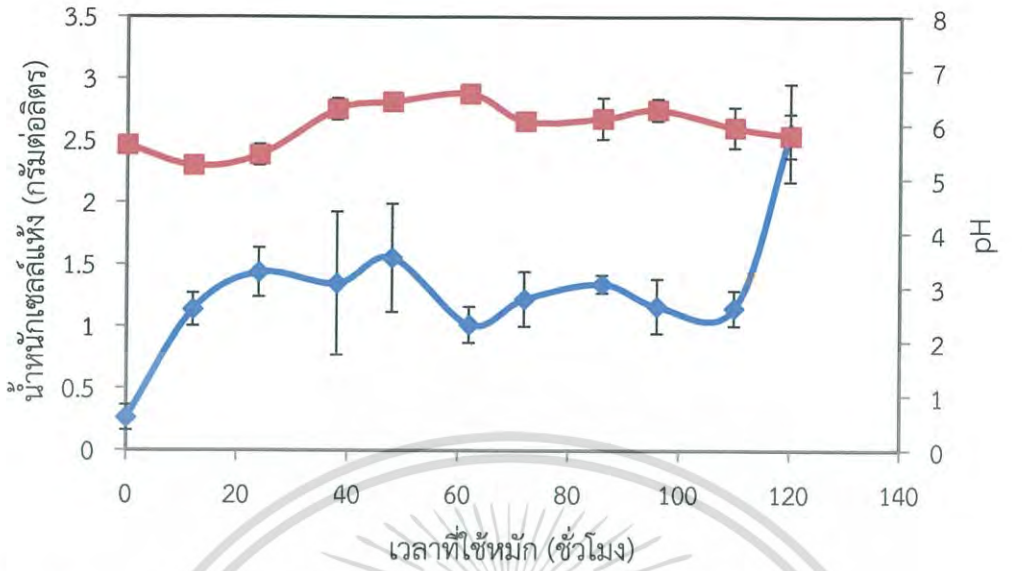
| เวลา (ชั่วโมง) | พีเอช | น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) | ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 4.67 $^{f}$ ±0.03 | 0.56 $^{e}$ ±0.11 | 47.00 $^{a}$ ±0.00 | 4.73 $^{d}$ ±0.12 |
| 14 | 4.94 $^{e}$ ±0.01 | 0.86 $^{de}$ ±0.2 | 44.15 $^{ab}$ ±2.20 | 5.46 $^{ab}$ ±0.12 |
| 24 | 4.93 $^{e}$ ±0.10 | 1.14 $^{d}$ ±0.50 | 42.24 $^{b}$ ±1.79 | 5.68 $^{a}$ ±0.19 |
| 38 | 5.12 $^{d}$ ±0.07 | 2.02 $^{b}$ ±0.09 | 35.68 $^{c}$ ±3.77 | 4.83 $^{c,d}$ ±0.23 |
| 48 | 5.11 $^{d}$ ±0.07 | 1.18 $^{d}$ ±0.13 | 29.99 $^{d}$ ±3.04 | 5.13 $^{abcd}$ ±0.31 |
| 62 | 5.25 $^{c}$ ±0.05 | 1.77 $^{bc}$ ±0.01 | 25.84 $^{e}$ ±1.28 | 5.23 $^{abcd}$ ±0.27 |
| 72 | 5.90 $^{a}$ ±0.05 | 1.34 $^{cd}$ ±0.80 | 20.01 $^{f}$ ±0.40 | 5.13 $^{abcd}$ ±0.19 |
| 86 | 5.50 $^{b}$ ±0.05 | 1.85 $^{bc}$ ±0.02 | 21.53 $^{f}$ ±0.44 | 4.92 $^{bcd}$ ±0.44 |
| 96 | 5.11 $^{d}$ ±0.03 | 1.87 $^{bc}$ ±0.09 | 18.53 $^{f}$ ±1.90 | 5.08 $^{bcd}$ ±0.45 |
| 110 | 5.13 $^{d}$ ±0.10 | 1.92 $^{b}$ ±0.02 | 15.03 $^{g}$ ±1.98 | 4.83 $^{cd}$ ±0.31 |
| 120 | 5.28 $^{c}$ ±0.08 | 3.24 $^{a}$ ±0.08 | 21.17 $^{f}$ ±0.91 | 5.33 $^{abc}$ ±0.41 |

**หมายเหตุ** a b c d e f และ g ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

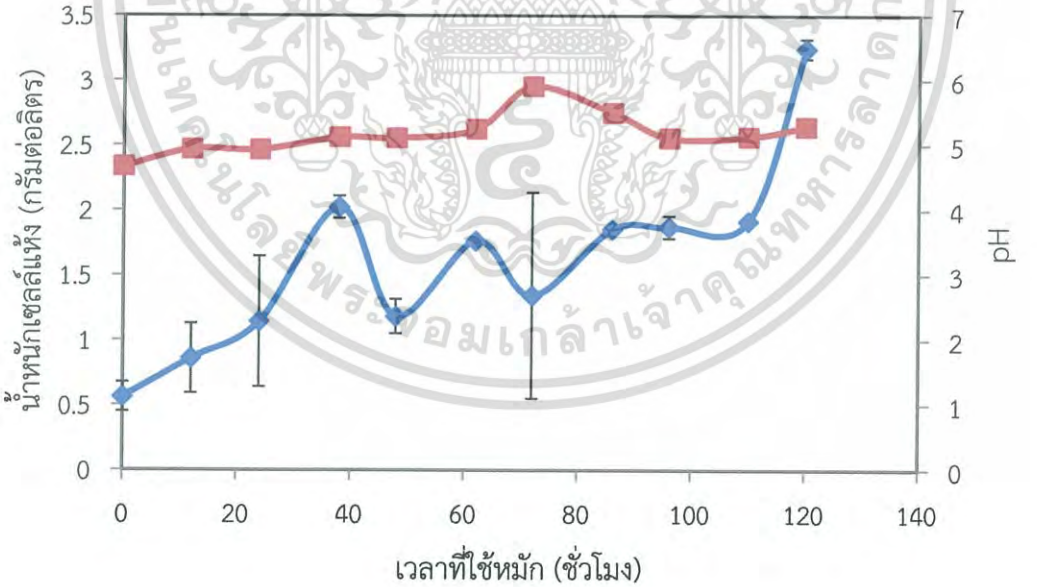



**รูปที่ 4.6** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง (■ คือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ , ◆ คือปริมาณโปรตีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำเอกสารนี้ไปเผยแพร่ต่อ




**รูปที่ 4.7** น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดและทริปโตน (■ คือค่าพีเอช, ◆ คือน้ำหนักเซลล์แห้ง)




**รูปที่ 4.8** น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. จากอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง (■ คือค่าพีเอช, ◆ คือน้ำหนักเซลล์แห้ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.8** ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดแลคติก บิวทิริก และอะซิตริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน

| เวลา (ชั่วโมง) | อะซิโตน (กรัมต่อลิตร) | บิวทานอล (กรัมต่อลิตร) | เอทานอล (กรัมต่อลิตร) | กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) | กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร) | กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | $0.000^{e}$ ±0.000 | $0.659^{g}$ ±0.066 | $0.069^{f}$ ±0.002 | $0.128^{de}$ ±0.015 | $0.517^{de}$ ±0.025 | $2.751^{a}$ ±0.150 |
| 14 | $0.000^{e}$ ±0.000 | $2.411^{f}$ ±0.211 | $0.066^{f}$ ±0.009 | $0.162^{d}$ ±0.004 | $2.517^{a}$ ±0.168 | $1.842^{bc}$ ±0.098 |
| 24 | $0.000^{e}$ ±0.000 | $5.399^{e}$ ±0.569 | $0.090^{ef}$ ±0.005 | $0.101^{ef}$ ±0.001 | $1.556^{bc}$ ±0.921 | $1.506^{d}$ ±0.232 |
| 38 | $0.224^{e}$ ±0.039 | $9.402^{d}$ ±0.277 | $0.130^{abc}$ ±0.008 | $0.133^{de}$ ±0.027 | $1.048^{cd}$ ±0.182 | $1.461^{d}$ ±0.114 |
| 48 | $1.161^{d}$ ±0.188 | $9.397^{d}$ ±0.109 | $0.121^{bcd}$ ±0.023 | $0.062^{g}$ ±0.005 | $1.065^{cd}$ ±0.154 | $1.332^{d}$ ±0.053 |
| 62 | $1.178^{d}$ ±0.047 | $10.265^{cd}$ ±0.188 | $0.118^{cd}$ ±0.003 | $0.080^{fg}$ ±0.007 | $1.458^{bc}$ ±0.099 | $1.396^{d}$ ±0.044 |
| 72 | $1.144^{d}$ ±0.019 | $10.708^{bc}$ ±0.134 | $0.152^{a}$ ±0.006 | $0.228^{bc}$ ±0.031 | $1.909^{b}$ ±0.029 | $1.716^{c}$ ±0.022 |
| 86 | $1.217^{d}$ ±0.121 | $11.583^{ab}$ ±0.318 | $0.146^{ab}$ ±0.007 | $0.137^{de}$ ±0.011 | $1.471^{bc}$ ±0.547 | $1.822^{c}$ ±0.010 |
| 96 | $2.364^{c}$ ±0.058 | $11.269^{abc}$ ±1.118 | $0.151^{a}$ ±0.039 | $0.308^{a}$ ±0.029 | $0.000^{d}$ ±0.000 | $1.826^{c}$ ±0.182 |
| 110 | $2.755^{b}$ ±0.340 | $11.792^{a}$ ±1.355 | $0.098^{de}$ ±0.007 | $0.211^{c}$ 1±0.022 | $0.000^{d}$ ±0.000 | $1.941^{bc}$ ±0.168 |
| 120 | $3.165^{a}$ ±0.086 | $12.146^{a}$ ±0.074 | $0.104^{cde}$ ±0.006 | $0.257^{b}$ ±0.032 | $0.000^{d}$ ±0.000 | $2.058^{b}$ ±0.036 |

**หมายเหตุ** a b c d e f และ g ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางที่ 4.9** ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดแลคติก บิวทิริก และอะซิติก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง

| เวลา (ชั่วโมง) | อะซิโตน (กรัมต่อลิตร) | บิวทานอล (กรัมต่อลิตร) | เอทานอล (กรัมต่อลิตร) | กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) | กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร) | กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | $0.000^{e}\pm0.000$ | $0.696^{g}\pm0.122$ | $0.058^{d}\pm0.002$ | $0.052^{ab}\pm0.009$ | $0.503^{c}\pm0.109$ | $2.434^{a}\pm0.077$ |
| 14 | $0.000^{e}\pm0.000$ | $1.148^{fg}\pm0.074$ | $0.053^{d}\pm0.003$ | $0.142^{ab}\pm0.036$ | $1.210^{a}\pm0.034$ | $1.885^{b}\pm0.047$ |
| 24 | $0.419^{e}\pm0.373$ | $1.935^{f}\pm0.551$ | $0.042^{d}\pm0.008$ | $0.040^{b}\pm0.013$ | $0.613^{c}\pm0.277$ | $1.147^{c}\pm0.206$ |
| 38 | $1.438^{d}\pm0.154$ | $5.507^{e}\pm0.261$ | $0.268^{bc}\pm0.010$ | $0.238^{a}\pm0.294$ | $0.849^{b}\pm0.025$ | $1.131^{c}\pm0.065$ |
| 48 | $2.712^{c}\pm0.095$ | $7.095^{d}\pm0.254$ | $0.268^{bc}\pm0.013$ | $0.050^{ab}\pm0.017$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.787^{d}\pm0.030$ |
| 62 | $2.951^{bc}\pm0.026$ | $8.548^{c}\pm0.193$ | $0.293^{bc}\pm0.005$ | $0.060^{ab}\pm0.008$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.429^{de}\pm0.097$ |
| 72 | $3.108^{abc}\pm0.201$ | $9.368^{bc}\pm0.582$ | $0.237^{c}\pm0.114$ | $0.126^{ab}\pm0.026$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.731^{de}\pm0.560$ |
| 86 | $3.426^{a}\pm0.066$ | $10.522^{ab}\pm0.281$ | $0.368^{a}\pm0.018$ | $0.113^{ab}\pm0.032$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.409^{e}\pm0.026$ |
| 96 | $3.024^{abc}\pm0.555$ | $9.612^{abc}\pm1.789$ | $0.319^{ab}\pm0.034$ | $0.119^{ab}\pm0.026$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.421^{de}\pm0.017$ |
| 110 | $3.308^{ab}\pm0.094$ | $10.435^{ab}\pm0.241$ | $0.298^{abc}\pm0.036$ | $0.093^{ab}\pm0.068$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.456^{de}\pm0.033$ |
| 120 | $3.317^{ab}\pm0.106$ | $10.803^{a}\pm0.441$ | $0.274^{bc}\pm0.009$ | $0.117^{ab}\pm0.004$ | $0.000^{d}\pm0.000$ | $0.489^{de}\pm0.043$ |

**หมายเหตุ** a b c d e f และ g ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.8 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นกลูโคสและแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน และการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองที่แสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าปริมาณอะซิโตนชุดควบคุมมีปริมาณสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมงได้เท่ากับ 3.1647 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลที่สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเป็น 12.1464 กรัมต่อลิตร เอทานอลสูงสุดอยู่ที่เวลา 72 มีค่าเท่ากับ 0.1523 กรัมต่อลิตร และตัวอย่างน้ำหมักที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีปริมาณอะซีโตนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 86 โดยมีค่าเท่ากับ 3.4256 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลที่สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเป็น 10.8034 กรัมต่อลิตรตามและเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 86 มีค่าเท่ากับ 0.3676 กรัมต่อลิตร

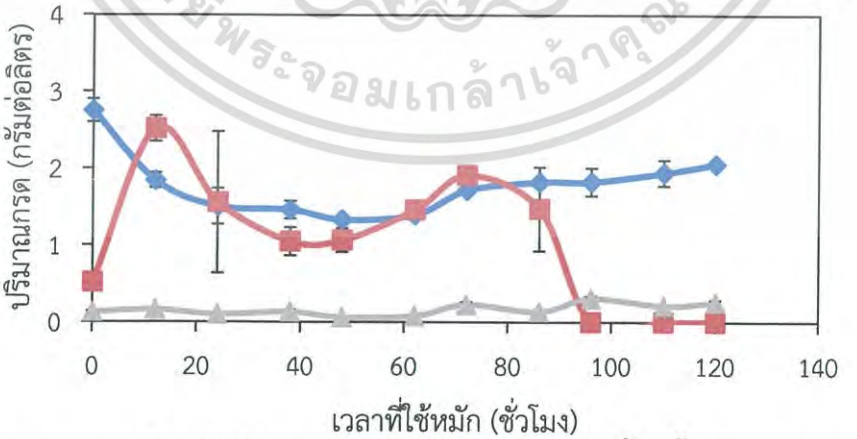
เมื่อนำปริมาณบิวทานอล และเอทานอลของตัวอย่างที่ได้จากการหมักทั้ง 2 แบบมาเปรียบเทียบกันทางสถิติโดยเปรียบเทียบจากค่าสูงสุดที่ได้ในช่วงเวลาการหมักที่เท่ากัน คือชุดควบคุมสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุดที่ 120 ชั่วโมงมีปริมาณ 12.1464 กรัมต่อลิตร และกากถั่วเหลืองผลิตได้สูงสุดที่ 120 ชั่วโมงมีปริมาณ 10.8034 กรัมต่อลิตร จึงเลือกเปรียบเทียบปริมาณบิวทานอลทั้งสองแบบการทดลองที่ 120 ชั่วโมง พบว่าให้ผลแตกต่างกันทางสถิติ $p < 0.05$ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์และแหล่งโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพกากถั่วเหลือง มีปริมาณบิวทานอลที่ได้น้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Pan และคณะ (2012) ที่ได้ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอลน้อยลงเมื่อย่อยซังข้าวโพดที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลืองด้วยกรดโดยได้ปริมาณบิวทานอล 6.81 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่ได้ปริมาณบิวทานอลถึง 10.80 กรัมต่อลิตร เนื่องจากว่าในกรดที่ใช้ย่อยมีตัวยับยั้งอยู่และจากงานวิจัยของ ณัฐพงษ์ และคณะ (2555) กล่าวไว้ว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยกรดต้องนำไปปรับสภาพก่อนนำไปใช้ และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Dong และคณะ (2015) ที่รายงานว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 8.9 กรัมต่อลิตรซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับบิวทานอลในตารางที่ 4.9 ที่เมื่อใช้กากถั่วเหลืองแทนที่แหล่งไนโตรเจนในอาหาร T6 นอกจากนี้สุนทรและคณะ (2555) กล่าวว่าความเข้มข้นของบิวทิริกจะต่ำที่ค่าพีเอชต่ำ ซึ่งในการทดลองไม่มีการปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมโดยพีเอชเริ่มต้นของการหมักอยู่ที่พีเอช 4.67 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อผลิตบิวทานอลได้น้อยกว่าชุดควบคุม

ปริมาณเอทานอลค่าสูงสุดของชุดควบคุมถูกผลิตเมื่อชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณ 0.1523 กรัมต่อลิตร มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีปริมาณ 0.1507 กากถั่วเหลืองปริมาณเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 86 ชั่วโมง มีปริมาณ 0.3676 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีปริมาณ 0.3192 กรัมต่อลิตร จึงเลือกเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้สูงสุดทั้งสองแบบการทดลองชั่วโมงที่ 96 พบว่าให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์และแหล่งโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพถั่วเหลือง มีปริมาณเอทานอลที่ได้มากกว่าชุดควบคุมอาจจะเกิดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่ในอาหารมีแอมโมเนียมอะซิเตทอยู่ด้วย ทำให้เชื้อสามารถนำไปใช้ผลิตเอทานอลได้ (สุนทร และคณะ, 2555) และจากงานวิจัยของ Dong และคณะ (2014) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ลำต้นฝ้าย และกากมันสำปะหลัง พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสได้ความเข้มข้นบิวทานอลเท่ากับ 9.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ลำต้นฝ้ายได้ 10.8 กรัมต่อลิตรและเมื่อใช้กากมันสำปะหลังได้เท่ากับ 11.2 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ Dong และคณะ (2014) ยังทำการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนโดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัด น้ำหมักข้าวโพด และกากถั่วเหลือง และใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้เมื่อใช้ยิสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนคือ 9.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำหมักข้าวโพดได้ 8.0 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กากถั่วเหลืองได้ 8.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองของ Dong และคณะ (2014) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อเช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน

จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 ค่าพีเอชที่ได้จากการทดลองทั้งสองแบบพบว่า ชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 14 เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการสร้างกรดทำให้มีการสร้างกรดออกมา พีเอชจึงมีค่าลดลงโดยชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 14 เป็น 5.62 และ 5.25 ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 ค่าพีเอชเริ่มสูงขึ้นจากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลเพิ่มมากขึ้น เชื้ออาจจะเข้าสู่ระยะสร้างผลิตภัณฑ์ทำให้ค่าพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 62 และลดลงอีกครั้งในชั่วโมงที่ 72 และมีแนวโน้มลดลงจนถึงระยะสุดท้ายของการหมักที่ชั่วโมงที่ 120 โดยมีค่าพีเอชเป็น 5.80 ชุดทดลองที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการสร้างกรดในชั่วโมงเดียวกันกับชุดควบคุมคือชั่วโมงที่ 14 โดยมีค่าพีเอช 4.94 และเริ่มเข้าสู่ระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่ชั่วโมงที่ 38 โดยมีค่าพีเอชเพิ่มเป็น 5.12 และสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจนไปถึงชั่วโมงที่ 96 แล้วคงที่ในขณะเดียวกันค่าพีเอชก็เริ่มลดลงเมื่อดูจากรูปที่ 4.8 จะเห็นว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มคงที่เนื่องจากอยู่ในระยะคงที่มีอัตราการเกิดและตายเท่ากันทำให้การผลิตคงที่เช่นกัน ส่วนพีเอชที่ลดลงเกิดจากที่มีการเติมอาหารที่ไม่ได้ผ่านการปรับพีเอชลงไปในอาหารตลอดจนการหมักสิ้นสุด



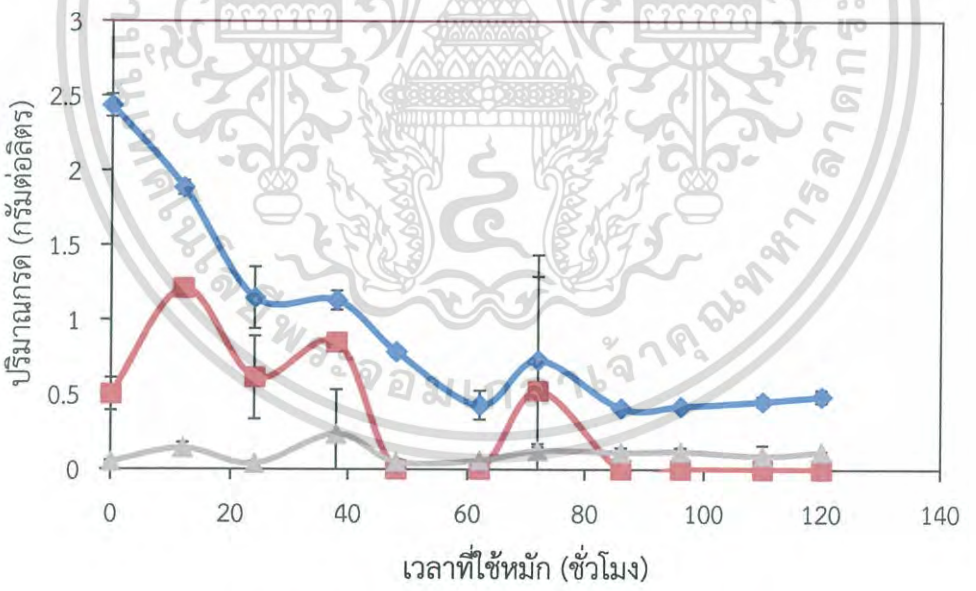

**รูปที่ 4.9** ปริมาณกรดอะซิติก บิวทีริก และแลกติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน (◆ คือปริมาณอะซิติก, ■ ปริมาณบิวทีริก, ▲ ปริมาณแลกติก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.10** ปริมาณค่าผลได้ อัตราการผลิตของบิวทานอล เอทานอล อะซิโตน และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองทางสถิติ

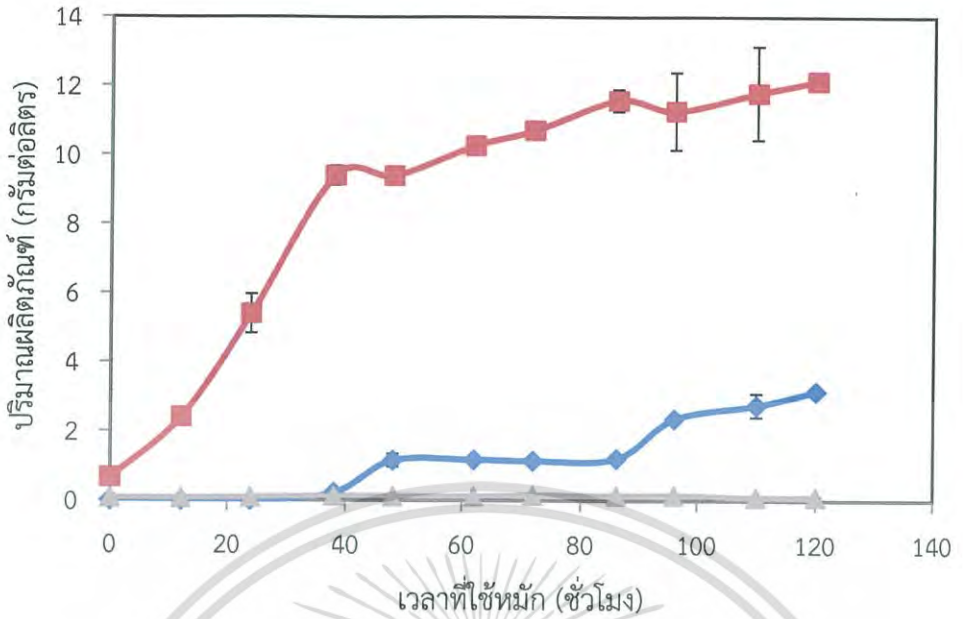
| การวิเคราะห์ | การทดลอง | เวลา | ปริมาณสูงสุด (g/L) | ค่าผลได้ (g/g) | อัตราการผลิต (g/L/h) |
|---|---|---|---|---|---|
| น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด | ชุดควบคุม | 120 | $2.563^{b}$ ±0.39 | $0.093^{b}$ ±0.15 | $0.019^{a}$ ±0.00 |
| | ชุดทดลอง | 120 | $3.243^{a}$ ±0.08 | $0.125^{a}$ ±0.00 | $0.022^{a}$ ±0.00 |
| บิวทานอล | ชุดควบคุม | 120 | $12.146^{a}$ ±0.07 | $0.440^{a}$ ±0.00 | $0.095^{a}$ ±0.00 |
| | ชุดทดลอง | 120 | $10.803^{b}$ ±0.44 | $0.418^{a}$ ±0.02 | $0.084^{b}$ ±0.00 |
| เอทานอล | ชุดควบคุม | 96 | $0.150^{b}$ ±0.04 | $0.006^{b}$ ±0.00 | $0.001^{b}$ ±0.00 |
| | ชุดทดลอง | 96 | $0.319^{a}$ ±0.03 | $0.011^{a}$ ±0.00 | $0.003^{a}$ ±0.00 |
| อะซิโตน | ชุดควบคุม | 120 | $3.164^{a}$ ±0.09 | $0.114^{b}$ ±0.00 | $0.026^{b}$ ±0.00 |
| | ชุดทดลอง | 120 | $3.317^{a}$ ±0.11 | $0.128^{a}$ ±0.01 | $0.028^{a}$ ±0.00 |

**หมายเหตุ** a และ b ที่อยู่ในแถวแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

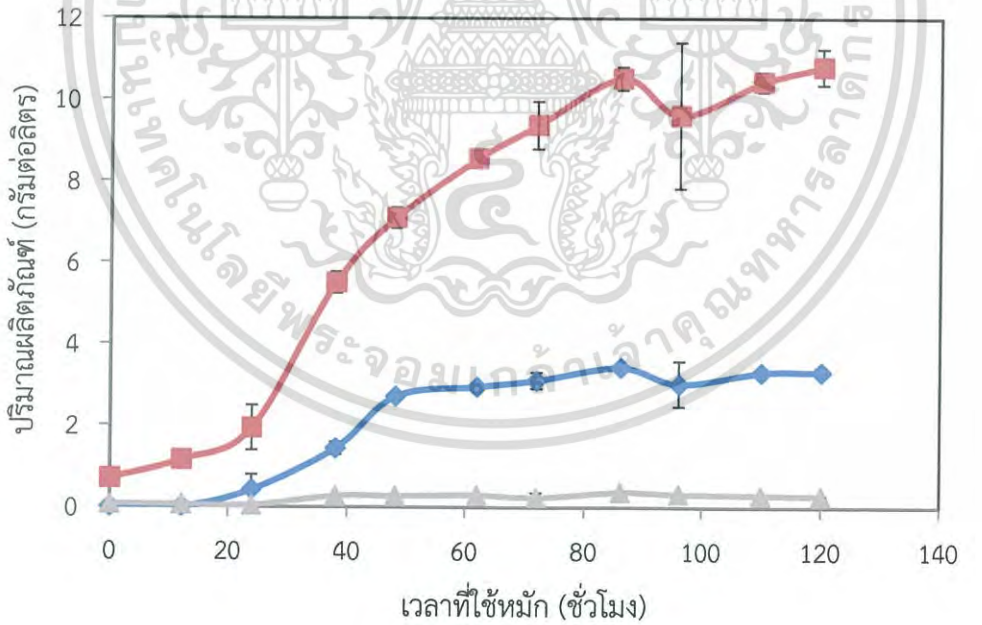



**รูปที่ 4.10** ปริมาณกรดอะซิติก บิวทีริก และแลกติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง (◆ คือปริมาณอะซิติก, ■ ปริมาณบิวทิริก, ▲ ปริมาณแลกติก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.11** ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งโปรตีนเป็นยีสต์สกัดกับทริปโตน (◆ คือปริมาณอะซิโตน, ■ ปริมาณบิวทานอล, ▲ปริมาณเอทานอล)




**รูปที่ 4.12** ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง (◆ คือปริมาณอะซิโตน, ■ ปริมาณบิวทานอล, ▲ปริมาณเอทานอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. โดยใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากการวิเคราะห์สารประกอบหลักในกากถั่วเหลือง พบว่า มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 47.60ปริมาณไขมันร้อยละ 0.51 ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 6.33 ปริมาณเถ้าร้อยละ 6.94 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 28.44

ทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกและไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1, 0.08, 0.06, 0.04 และ 0.02 นอร์มอล และให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ด้วยเวลาที่แตกต่างกันคือ 10 20 และ 30 นาทีในอัตราส่วนตัวอย่าง 1 กรัมต่อสารละลายกรด 10 มิลลิลิตร และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากส่วนใส พบว่า สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนมากที่สุดคือ 13.116 และ 24.450 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จึงเลือกใช้สำหรับทำการย่อยกากถั่วเหลือง นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดไฮโดรคลอริก มาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยเครื่อง HPLC น้ำตาลรีดิวซ์ที่พบคือ กลูโคส มอลโตส ไซโลส แต่ไม่พบ เซลโลไบโอส

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. โดยใช้สูตรอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้เป็น 50 กรัมต่อลิตร และโปรตีนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตรโดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. โดยใช้สูตรอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้นเป็น 50 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นยีตส์สกัดกับทริปโตน โดยทำการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง และเติมอาหาร T6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรทุกครั้งหลังเก็บ นำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry-Folin ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าเชื้อนำน้ำตาลไปใช้อย่างต่อเนื่องโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 47.00 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณลดลงและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 72 และได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.01 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดระยะการหมักชั่วโมงที่ 120 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดระยะการหมักชั่วโมงที่ 120 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้เท่ากับ 21.17 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าชุดทดลองเชื้อนำน้ำตาลไปใช้น้อยกว่าชุดควบคุมเพียงเล็กน้อย และปริมาณของโปรตีนในอาหารของชุดทดลองพบว่ามีปริมาณคงที่จากชั่วโมงเริ่มต้นที่ 0 มีค่า 4.73 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกันกับปริมาณโปรตีนในชุดควบคุมที่ชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 5.17 กรัมต่อลิตรและปริมาณคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 โดยปริมาณโปรตีนที่ได้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 4.75 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการทดลองทั้งสองแบบเชื้อนำโปรตีนไปใช้แต่ใช้ปริมาณเล็กน้อย ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า ปริมาณเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 ของชุดทดลองมีค่า 0.56 กรัมต่อลิตร จนครบระยะเวลาของการหมักชั่วโมงที่ 120 วัดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 3.24 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าชั่วโมงเริ่มต้นที่ 0 วัดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 0.26 กรัมต่อลิตร และเริ่มคงที่จนครบระยะเวลาของการหมักที่ 120 ชั่วโมง มีค่า 2.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากค่าปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งสองการทดลอง เมื่อครบเวลาหมักแสดงให้เห็นว่าชุดทดลองมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าชุดทดลอง

ค่าพีเอชของชุดลองนั้นเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 ได้เท่ากับ 5.62 และลดลงลงเป็น 5.25 ในชั่วโมงที่ 14 เนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดในชั่วโมงนี้และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเริ่มมีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนในชุดทดลองค่าพีเอชเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 คือ 4.67 และในระหว่างชั่วโมงที่ 14 และ 24 มีค่าพีเอช คงที่เนื่องจากมีการสร้างกรดช่วงนี้และค่าพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 38 เป็นต้นไปและมีพีเอชลดลงอีกครั้งในชั่วโมง 86 จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อมีการผลิตกรดคือ กรดแลคติก กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก แล้วยังผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในชุดควบคุมมีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 0 ได้เท่ากับ 2.75 กรัมต่อลิตร มีปริมาณบิวทิริกสูงสุดในชั่วโมง 14 เท่ากับ 2.52 กรัมต่อลิตร ปริมาณแลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.31 กรัมต่อลิตร ปริมาณอะซิโตนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 เท่ากับ 3.16 กรัมต่อลิตร บิวทานอลสูงสุดที่ชั่วโมง 120 ได้ 12.15 กรัมต่อลิตร และเอทานอลสูสุดที่ชั่วโมง 96 ได้ 0.15 กรัมต่อลิตร ส่วนชุดทดลองได้กรดอะซิติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 0 ได้เท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตร กรดบิวทิริกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 14 ได้ 1.21 กรัมต่อลิตร แลคติกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 38 ได้เท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร อะซิโตนสูงสุดที่ชั่วโมง 120 โดยได่เท่ากับ 3.32 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมง 120 ได้เท่ากับ 10.80 กรัมต่อลิตรและเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 86 ได้เท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตร เมื่อนำตัวทำละลายอินทรีย์ในชุดทดลองและชุดควบคุมมาเปรียบเทียบกันทางสถิติพบว่าเชื้อ *Clostridium* sp. สามารถผลิตบิวทานอลได้น้อยเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลูโคส แต่สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าชุดควบคุม ส่วนการผลิตอะซิโตนนั้นไม่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทั้งสองชุด จึงสามารถสรุปได้ว่า กากถั่วเหลืองสามารถใช้แทนที่แหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหาร T6 ได้แต่จะไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้ดีเท่าอาหาร T6 ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดและทริปโตนและใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยในครั้งนี้ควรทำการพัฒนาต่อยอดโดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักซึ่งมีกำลังการผลิตมากกว่าระดับฟลาสก์ สามารถควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่า

2. ควรทดลองและพัฒนางานวิจัยโดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มาจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ทดแทนจากการใช้สารอินทรีย์ และเพื่อลดต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


จันทรัสม์ โคมเวียน และ ชมภูนุช กลิ่นวงษ์. 2559. แหล่งคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตเอทานอล และบิวทานอลด้วยแบคทีเรียคลอสทริเดียม. บทความวิชาการ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชนิกา อื้อพานิช, ชมพูนุช วิรุณานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. ไบโอบิวทานอล : เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนบิวทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 22(3): 703-709.

ภัคธีมา สุขพันธ์. 2552. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองเสริมพรีไบโอติกสำหรับผู้บริโภคสูงอายุ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลีนา หง้าฝา. 2556. องค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์. 2554. การเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* โดยการใช้กลีเซอริลเป็นสารตั้งต้น. รายงานวิจัย: สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง.

สง่า ดามาพงษ์. [online]. Available http://www.tnamcot.com/content/146313 (accessed 6 มกราคม 2560)

สมใจ ศิริโภค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. [339]

สุนทร กาญจนทวี และอภิชัย สาวิสิทธิ์. 2555. การศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมัก. รายงานการวิจัย: สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อุทัย ไชยานนท์. 2543. ถั่วเหลือง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์น้ำฝน. หน้า 36, 44.

A.O.A.C. 1990. Official methods of analysis of the AOAC, 15th ed. Association of official analytical chemists, Arlington,USA.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Al-Shorgani, N. K. N. and Kalil, M. S. 2012. Biobutanol production from rice bran and de-oiled rice bran by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Bioprocess Biosyst Eng. 35 : 817–826.

Al-Shorgani, N. K. N., Tibin, E. M., Ali, E., Hamid, A. A., Yusoff, W. M. W. and Kalil, M. S. 2014. Biohydrogen production from agroindustrial wastes via *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). Clean Techn Environ Policy. 16: 11–21.

Alalayah, W. M., Kalil, M. S., Kadhum, A. A. H., Jahim, J. M. and Alauj, N. M. 2008. Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). International journal of hydrogen energy. 33: 7392-7396.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. The Associationof Official Analytical Chemists, Virginia,USA.

Banaszkiewicz, T. 2011. Nutritional Value of Soybean Meal. in Soybean and nutrition. El-Shemy, H. A. (editer). InTech. Rijeka. Croatia. Page 1-20.

Dong, J., Du, Y., Zhou, Y. and Yang, S. T.. 2014. Butanol Production from Soybean Hull and Soy Molasses by Acetone – Butanol - Ethanol Fermentation. Soy-Based Chemicals and Materials. 1178: 25-41.

Durre, P. 2008. Fermentative butanol production. Annals of the New York Academy of Science. 1125: 353-362.

Herrerat, A., S. J., TeÂllez-Luist, J. A., RamõÂrezt, M., VaÂzquez. 2003. Production of Xylose from Sorghum Straw Using Hydrochloric Acid. Journal of Cereal Science. 37: 267-264.

Kasap, M. 2002. Nitrogen Metabolism and Solvent Production in *Clostridium beilerinckii* NRRL B539. Appl Environ Microbiol. 67(11): 5127–5133.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Keirs, S., Shaheen, R. and Jones, D. T.. 2001. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 2095–2103.

Lee, J. S., B. Parameswaran., J. P. Lee and S. C. Park. 2008. Recent Developments of Key Technologies on Cellulosic Ethanol Production. Journal of Scientific & Industrial Research. 67: 865-873.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Department of Pharmacology, Washington University.

Mechmech, F., Marinova, M., Chadjaa, H., Rahni, M., Akacha N.B. and Gargouri, M. 2016. Alfalfa juice as a nitrogen source or supplement foracetone–butanol–Ethanol production by *Clostridium acetobutylicum*. Industrial Crops and Products. 78: 73–81.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 3: 426-428.

Nasr, N., Gupta, M., Hafez, H., El-Naggar, M. H. and Nakhla, G. 2017. Mono- and co-substrate utilization kinetics using mono- and co-culture of *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Bioresource Technology. 241: 152–160.

Noparat, P., Prasertsan, P. and O-Thong, S. 2011. Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. International Journal of Hydrogen Energy. 36: 14086-14092.

Pan, W., Peng, W., Xiong, L. and Chen, X. 2012. Application of soybean meal on Butanol production from corncob hydrolysate by *Clostridium* sp. CH012. Advanced Materials Research. 512-515: 500-505.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Van Eys, J. E., Offner, A. and Bach, A.. 2004. Chemical Analysis. Manual of Quality Analysis for Soybean Products in the Feed Industry. American Soybean Association.

Wang, Y., Zhang, Z. T., Seo, S. O., Choi K., Lu, T., Jin, Y. S. and Blaschek. 2015. Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. Journal of Biotechnology. 200: 1–5.

Zhao, X., Xing, D., Fu, N., Liu, B. and Ren, N.. 2011. Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. Bioresource Technology. 102: 8432–8436.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก
# ข้อมูลการเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

## การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจากวิธีของ Miller และคณะ, 1959)

**การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน**

- เตรียม stock น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เตรียมโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลายกลูโคสมาตราฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร มาปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

- เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000\ \mu g/mL\ (V_1) = (200\ \mu g/mL)(5\ mL)$$

$$V_1 = 1\ mL$$

ดังนั้นสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้กลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

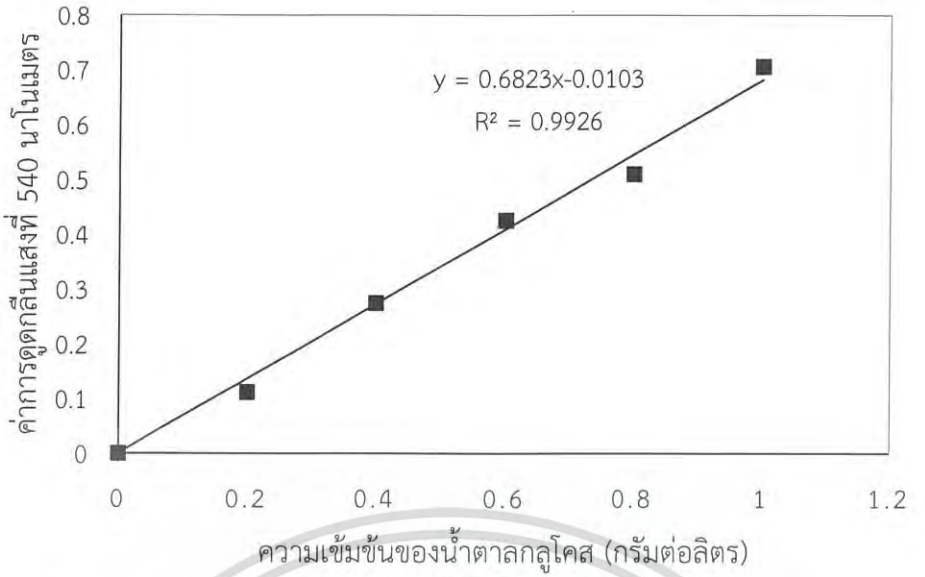
**การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร**

ละลาย NaOH 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆ เติม DNS 10 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (Sodium Potassium Tartrate) 200 กรัม เติมฟีนอล 0.2 กรัม และ $Na_2SO_3$ 0.5 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตามลำดับจนครบทุกตัว จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

**ตารางที่ ก.1** ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

| ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.2 | 0.1120 |
| 0.4 | 0.2743 |
| 0.6 | 0.4253 |
| 0.8 | 0.5097 |
| 1.0 | 0.7060 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.1** กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

**การเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล**

คำนวณหาปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ต้องใช้ ได้จากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 1.18

x = เปอร์เซ็นของกรด = 36

MW = มวลโมเลกุล = 36

$$C = \frac{(10)(1.18)(36)}{36} = 11.8 \text{ นอร์มอล}$$

นำค่าความเข้มข้นที่ได้เข้าสมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(11.8)\ V_1 = (0.1)(1000)$$

$$= 8.6 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นจึงทำการดูดกรดซัลฟิวริกมา 8.6 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

**การเตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล**

คำนวณหาปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ต้องใช้ ได้จากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

d = ความหนาแน่น = 1.84

x = เปอร์เซ็นของกรด = 98

MW = มวลโมเลกุล = 98.08

$$C = \frac{(10)(1.84)(98)}{98.08} = 1.84 \text{ นอร์มอล}$$

เนื่องจากว่ากรดซัลฟิวริกสามารถแตกตัวได้ 2 ครั้ง ทำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 18.4 = 36.8 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าความเข้มข้นที่ได้เข้าสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(18.4)\ V_1 = (0.1)(1000)$$
$$= 5.4347 \text{ มิลลิลิตร}$$

เนื่องจากมีการแตกตัวได้ 2 ครั้ง 5.4347/2 = 2.72 มิลลิลิตร

ดังนั้นดูดกรดซัลฟิวริกมา 2.72 มิลลิลิตรแล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตรจะได้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

## การเตรียมสารละลายเพื่อทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method) (ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)

**การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu**

- เตรียมสารละลาย ก ละลายโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) 20 กรัมต่อลิตร ในสารละลายโซเดียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
- เตรียมสารละลาย ข ละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($CuSO_45H_2O$) ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในสารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร
- เตรียมสารละลาย ค สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper) เตรียมโดยผสมสารละลาย ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย ข ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมเมื่อต้องการใช้)
- สารละลาย Folin Ciocalteu นำสาร Folin-Ciocalteu (ความเข้มข้น 2 นอร์มัล) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

**สารละลายมาตรฐานของโปรตีน**

- ละลาย bovine serum albumin (BSA) ในระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานจากซีรั่มวัว (Bovine Serum Albomine, BSA) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร โดยละลายปริมาตร

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| สารละลาย | 1000 | มิลลิลิตร ต้องชั่ง BSA | 1 | กรัม |
| ถ้าสารละลาย | 100 | มิลลิลิตร ต้องชั่ง BSA | 0.1 | กรัม |

ดังนั้น ชั่ง BSA กรัม 0.1 กรัม นำ BSA ที่ชั่งได้ละลายน้ำลงไปในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร คำนวณจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

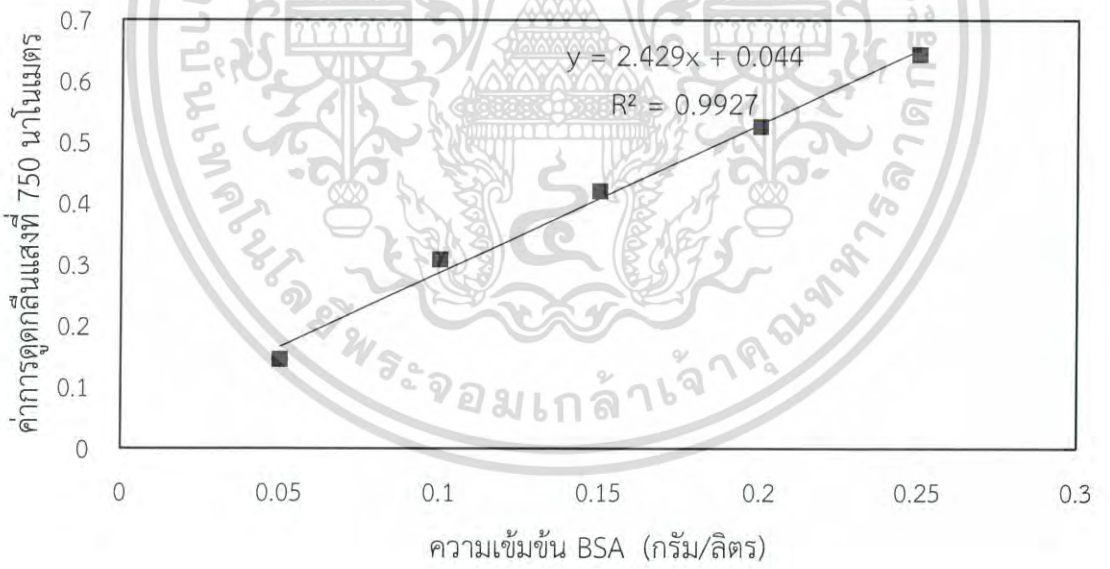
$$(1\ g/L)(V_1) = (0.05\ g/L)(10\ mL)$$

$$V_1 = 0.5 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ใช้สารละลาย BSA 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

**ตารางที่ ก.2** ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method)

| ความเข้มข้นสารละลาย BSA (กรัมต่อลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 0.05 | 0.145 |
| 0.1 | 0.308 |
| 0.15 | 0.42 |
| 0.2 | 0.5255 |
| 0.25 | 0.6435 |




**รูปที่ ก.2** กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การเตรียมสารละลายอินทรีย์มาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ HPLC

### การเตรียมสารละลายกรดอะซิติก (Acetic acid) มาตรฐาน

ความเข้มข้นของกรดอะซิติกคือ 99.98% มวลโมเลกุล 60.05 และความหนาแน่นที่ 25 °c คือ 1.05 คำนวณความเข้มข้นกรดอะซิติกจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 1.05

x = เปอร์เซ็นของกรด = 99.8

MW = มวลโมเลกุล = 60.05

$$C = \frac{(10)(1.05)(99.8)}{60.05} = 17.45 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(17.45)(V_1) = (1.0)(20 \text{ ml})$$

$$V_1 = 1.15 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Standard) กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1.0)(V_1) = (0.2)(10 \text{ ml})$$

$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (Molar)(MW)$$

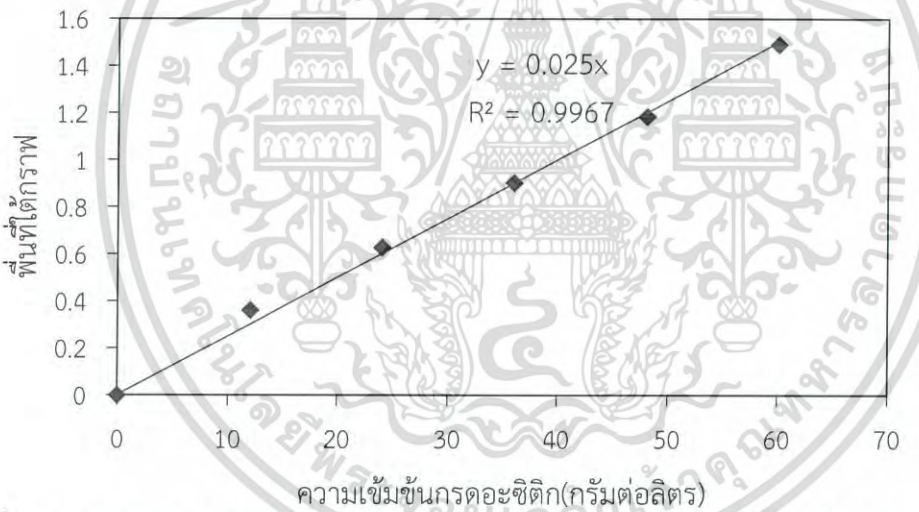
เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 60.05

$$g/l = (0.2)(60.05) = 12.01 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ก.3** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟกรดอะซิติก | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟกรดอะซิติก/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 12.01 | 982447 | 2717155 | 0.361571938 |
| 0.4 | 24.02 | 1691623 | 2696277 | 0.627392141 |
| 0.6 | 36.03 | 2498789 | 2767550 | 0.902888475 |
| 0.8 | 48.04 | 3538774 | 2986155 | 1.185060387 |
| 1.0 | 60.05 | 4495976 | 3017263 | 1.490084225 |




**รูปที่ ก.3** กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดอะซิติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริก (Butiric acid) มาตรฐาน**

ความเข้มข้นกรดบิวทิริกคือ 99% มวลโมเลกุล 88.11 ความหนาแน่นที่ 25°c คือ 0.958 คำนวณความเข้มข้นกรดบิวทิริกจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 0.958

x = เปอร์เซ็นของกรด = 99

MW = มวลโมเลกุล = 88.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C = \frac{(10)(0.958)(99)}{88.11} = 10.76 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) กรดบิวทิริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(10.76)(V_1) = (1.0)(25 \text{ ml})$$
$$V_1 = 2.32 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Stardard) กรดบิวทิริกความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(1.0)(V_1) = (0.2)(10 \text{ ml})$$
$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดบิวทิริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (\text{Molar})(MW)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 88.11

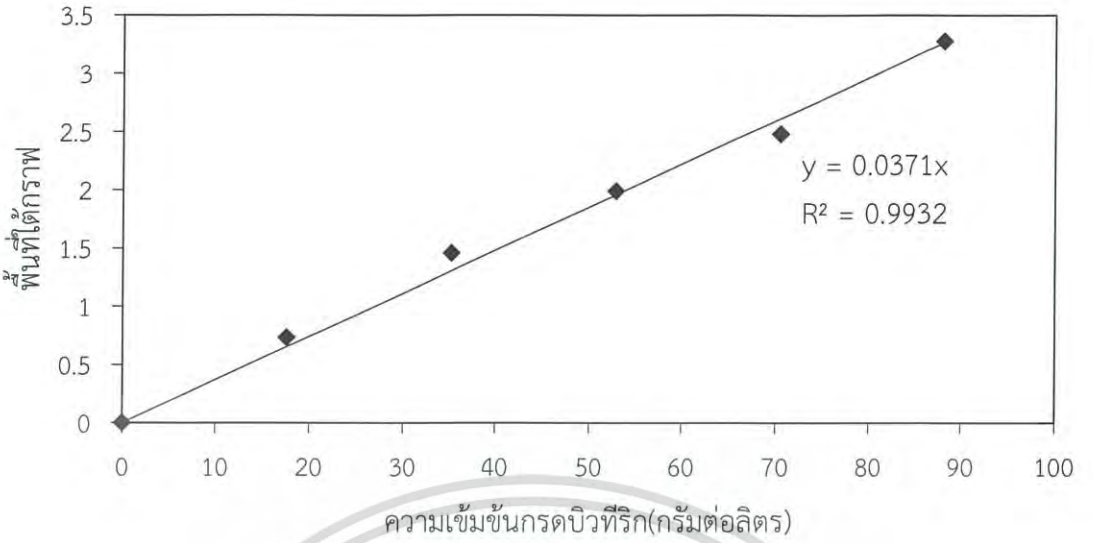
$$g/l = (0.2)(88.11) = 17.622 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 17.622 กรัมต่อลิตร

**ตารางที่ ก.4** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นกรดบิวทิริกมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นกรดบิวทิริกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟกรดบิวทิริก | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟกรดบิวทิริก/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 17.622 | 2028573 | 2764808 | 0.733712 |
| 0.4 | 35.244 | 4079808 | 2798637 | 1.457784 |
| 0.6 | 52.866 | 5520455 | 2774590 | 1.989647 |
| 0.8 | 70.488 | 6913946 | 2787546 | 2.480298 |
| 1.0 | 88.11 | 9159272 | 2795656 | 3.276251 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.4** กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดบิวทิริก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายกรดแลคติก (Lactic acid) มาตรฐาน**

ความเข้มข้นกรดแลคติกคือ 85% มวลโมเลกุล 112.06 ความหนาแน่นที่ 25 °c คือ 1.27 คำนวณความเข้มข้นกรดแลคติกจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 1.25

x = เปอร์เซ็นของกรด = 85

MW = มวลโมเลกุล = 112.06

$$C = \frac{(10)(1.25)(85)}{112.06} = 9.63 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) กรดแลคติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(9.63)(V_1) = (1.0)(20 \text{ ml})$$
$$V_1 = 2.08 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Stardard) กรดแลคติกความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(1.0)(V_1) = (0.2)(10\ ml)$$
$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้กรดแลคติกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (Molar)(MW)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 112.06

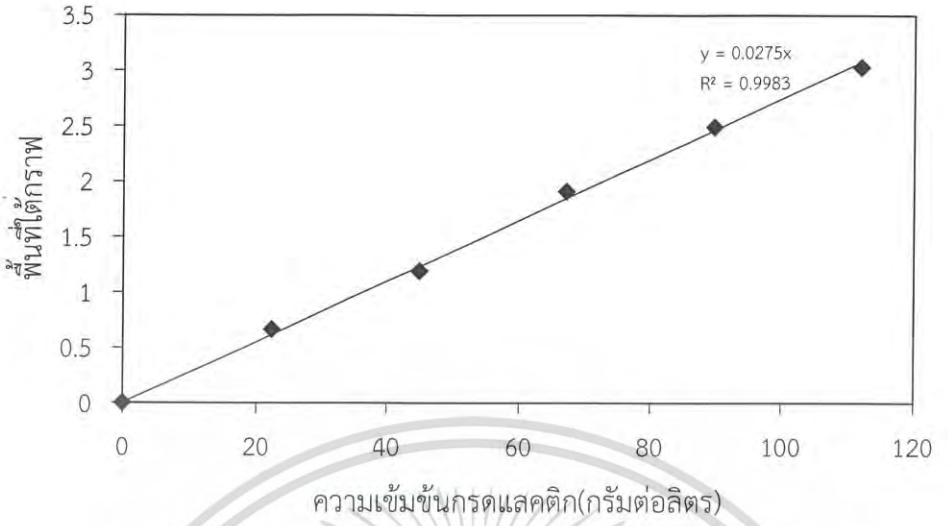
$$g/l = (0.2)(112.06) = 22.412 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 22.412 กรัมต่อลิตร

**ตารางที่ ก.5** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟกรดแลคติก | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟกรดแลคติก/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 22.412 | 1873179 | 2829642 | 0.661984 |
| 0.4 | 44.824 | 3347222 | 2813390 | 1.189747 |
| 0.6 | 67.236 | 5266410 | 2760530 | 1.907753 |
| 0.8 | 89.648 | 6937082 | 2784393 | 2.491416 |
| 1.0 | 112.06 | 8645968 | 2854851 | 3.028518 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.5** กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลคติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายอะซิโตน (Acetone) มาตรฐาน**

ความเข้มข้นอะซิโตนคือ 99.98% มวลโมเลกุล 58.05 และความหนาแน่นที่ 25°c คือ 0.791 คำนวณความเข้มข้นอะซิโตนจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 0.791

x = เปอร์เซ็นของกรด = 99.98

MW = มวลโมเลกุล = 58.05

$$C = \frac{(10)(0.791)(99.98)}{58.05} = 13.62 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) อะซิโตนความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(13.62)(V_1) = (1.0)(25 \text{ ml})$$

$$V_1 = 1.89 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Stardard) อะซิโตนความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(1.0)(V_1) = (0.2)(10\ ml)$$
$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้อะซิโตนความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (Molar)(MW)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 58.05

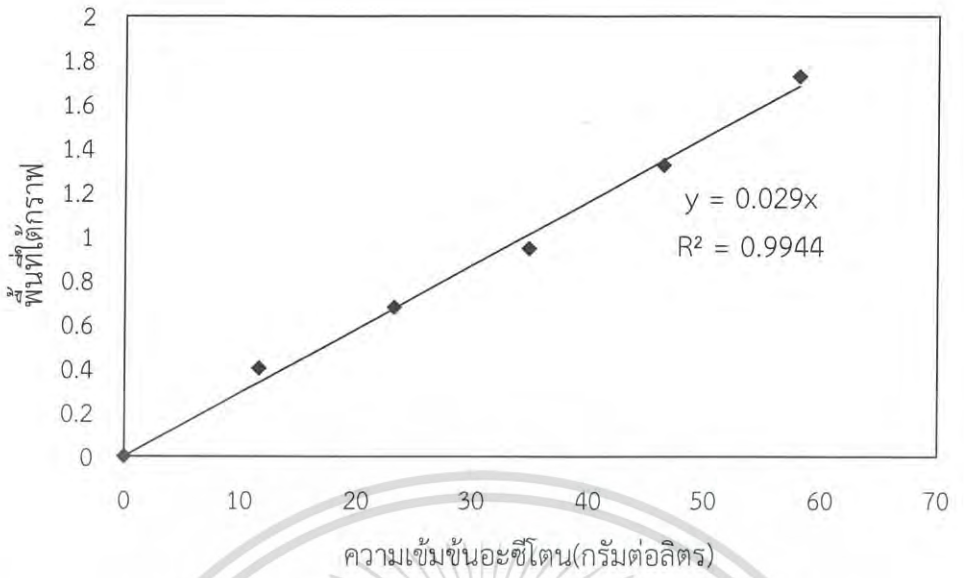
$$g/l = (0.2)(58.05) = 11.61 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายอะซิโตนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 11.61 กรัมต่อลิตร

**ตารางที่ ก.6** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟกรดแลคติก | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟอะซิโตน/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 11.61 | 485571 | 1212371 | 0.4001 |
| 0.4 | 23.22 | 911652 | 1345066 | 0.6778 |
| 0.6 | 34.83 | 1334731 | 1414571 | 0.9436 |
| 0.8 | 46.44 | 1898191 | 1436005 | 1.3219 |
| 1.0 | 58.05 | 2349263 | 1361696 | 1.7252 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.6** กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายบิวทานอล (Butanol) มาตรฐาน**

ความเข้มข้นบิวทานอลคือ 99.7% มวลโมเลกุล 74.12 ความหนาแน่นที่ 25°c คือ 0.81 คำนวณความเข้มข้นจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 0.81

x = เปอร์เซ็นของกรด = 99.7

MW = มวลโมเลกุล = 74.12

$$C = \frac{(10)(0.81)(99.7)}{74.12} = 10.90 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) บิวทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10.90)(V_1) = (1.0)(10 \text{ ml})$$

$$V_1 = 0.92 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Stardard) บิวทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(1.0)(V_1) = (0.2)(1\ ml)$$
$$V_1 = 0.2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายบิวทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้บิวทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (Molar)(MW)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 74.12

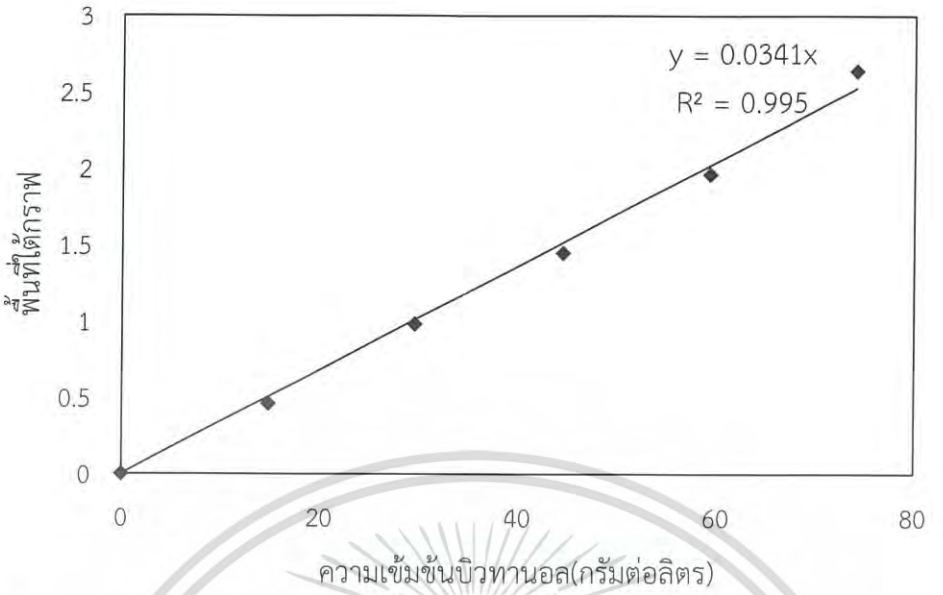
$$g/l = (0.2)(74.12) = 14.824 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 14.824 กรัมต่อลิตร

**ตารางที่ ก.7** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นบิวทานอลมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นบิวทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 14.824 | 723403 | 1570213 | 0.4607 |
| 0.4 | 29.648 | 1490879 | 1521784 | 0.9797 |
| 0.6 | 44.472 | 2274397 | 1571360 | 1.4474 |
| 0.8 | 59.296 | 2974902 | 1516435 | 1.9618 |
| 1.0 | 74.12 | 4112778 | 1561188 | 2.6382 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.7** กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายเอทานอล (Ethanol) มาตรฐาน**

ความเข้มข้นของเอทานอลคือ 99.5% มวลโมเลกุล 46.08 และความหนาแน่นที่ 25°c คือ 0.789 คำนวณความเข้มข้นของเอทานอลจากสูตร

$$C = \frac{(10)(dx)}{MW}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยนอร์มอลหรือโมลาร์

D = ความหนาแน่น = 0.789

x = เปอร์เซ็นของกรด = 99.5

MW = มวลโมเลกุล = 46.08

$$C = \frac{(10)(0.789)(99.5)}{46.08} = 17.04 \text{ โมลาร์}$$

- เตรียมสารละลาย (Stock) เอทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(17.04)(V_1) = (1.0)(100 \text{ ml})$$

$$V_1 = 5.87 \text{ มิลลิลิตร}$$

- เตรียมสารละลาย (Stardard) เอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(1.0)(V_1) = (0.2)(1\ ml)$$
$$V_1 = 0.2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ใช้เอทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

- เปลี่ยนหน่วยจากโมลาร์เป็นกรัมต่อลิตรจาก

$$g/l = (Molar)(MW)$$

เมื่อ MW = มวลโมเลกุล = 46.08

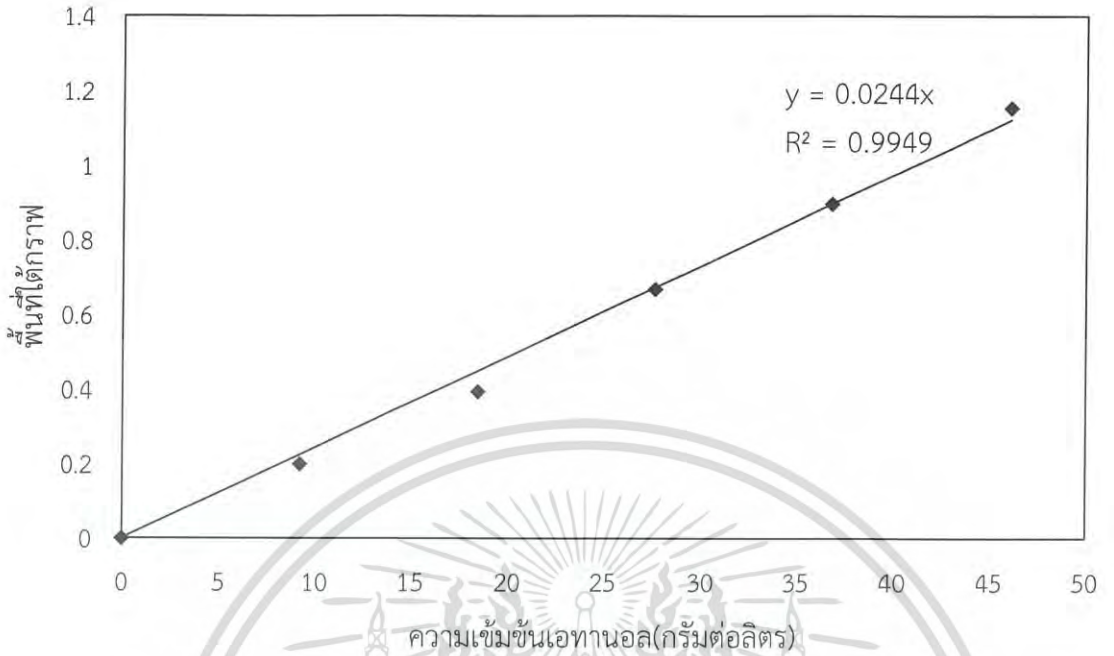
$$g/l = (0.2)(46.08) = 9.212 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 9.212 กรัมต่อลิตร

**ตารางที่ ก.8** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์) | ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล | พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก | พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล/พื้นที่ใต้กราฟกรดซิตริก |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0.2 | 9.212 | 345758 | 1740630 | 0.1986 |
| 0.4 | 18.424 | 676090 | 1720097 | 0.3931 |
| 0.6 | 27.636 | 1000061 | 1496650 | 0.6682 |
| 0.8 | 36.848 | 1362447 | 1519770 | 0.8965 |
| 1.0 | 46.06 | 1700647 | 1473749 | 1.1540 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ ก.8** กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

## การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

**การเตรียมน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน**

- เตรียมสารละลาย (Stock) 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย (Standard) กลูโคสความเข้มข้น 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10\ g/l)(V_1) = (2\ g/l)(10\ ml)$$

$$V_1 = 2 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ ก.9** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟกลูโคส | พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล | พื้นที่ใต้กราฟกลูโคส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 277386 | 3200913 | 0.0867 |
| 4 | 586016 | 3201849 | 0.1830 |
| 6 | 992116 | 3268403 | 0.3036 |
| 8 | 1373950 | 3198612 | 0.4296 |
| 10 | 1902393 | 3205865 | 0.5934 |

**รูปที่ ก.9** กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐาน**

- เตรียมสารละลาย (Stock) 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลไซโลส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย (Standard) ไซโลสความเข้มข้น 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10\ g/l)(V_1) = (2\ g/l)(10\ ml)$$

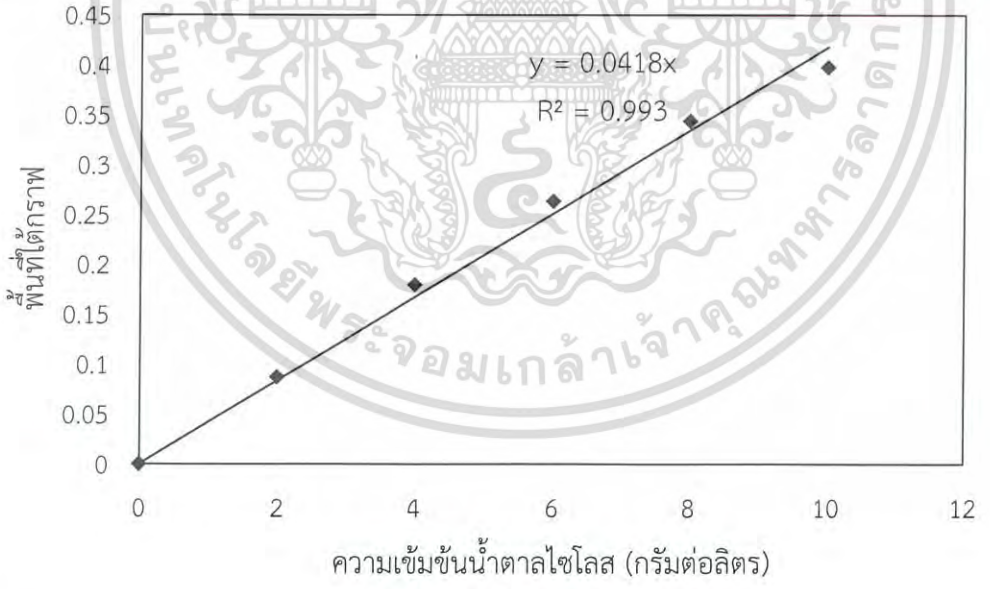
$$V_1 = 2\ \text{มิลลิลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นสารละลายไซโลสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้ไซโลสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

**ตารางที่ ก.10** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2-10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นไซโลสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟไซโลส | พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล | พื้นที่ใต้กราฟไซโลส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 280603 | 2338002 | 0.0869 |
| 4 | 575498 | 3208777 | 0.1794 |
| 6 | 841451 | 3194775 | 0.2632 |
| 8 | 1118613 | 3255592 | 0.3436 |
| 10 | 1288382 | 3240513 | 0.3976 |




**รูปที่ ก.10** กราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐาน**

- เตรียมสารละลาย (Stock) 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เตรียมสารละลาย (Standard) เซลโลไบโอสความเข้มข้น 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(10\ g/l)(V_1) = (2\ g/l)(10\ ml)$$
$$V_1 = 2\ \text{มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้เซลโลไบโอสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

**ตารางที่ ก.11** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2-10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นเซลโลไบโอสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟเซลโลไบโอส | พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล | พื้นที่ใต้กราฟเซลโลไบโอส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 343772 | 3211231 | 0.1071 |
| 4 | 714027 | 3201345 | 0.2230 |
| 6 | 909611 | 3208048 | 0.2835 |
| 8 | 1199403 | 3262181 | 0.3677 |
| 10 | 1438008 | 3252398 | 0.4421 |

**รูปที่ ก.11** กราฟมาตรฐานของสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การเตรียมสารละลายมอลโตสมาตรฐาน**

- เตรียมสารละลาย (Stock) 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลมอลโตส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- เตรียมสารละลาย (Standard) มอลโตสความเข้มข้น 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

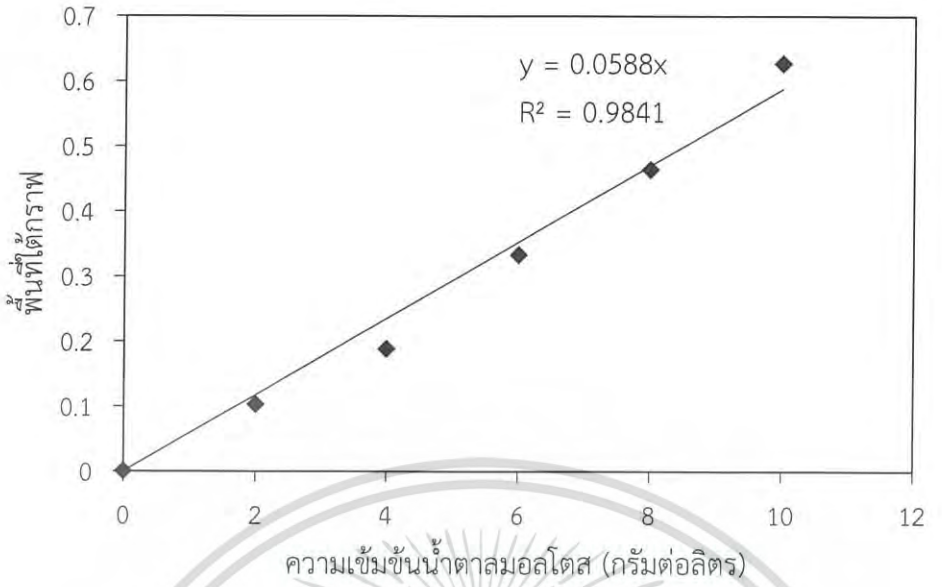
$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$(10\ g/l)(V_1) = (2\ g/l)(10\ ml)$$
$$V_1 = 2\ \text{มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นสารละลายมอลโตสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้มอลโตสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

**ตารางที่ ก.12** พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมอลโตสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2-10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines®Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นมอลโตสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร) | พื้นที่ใต้กราฟมอลโตส | พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล | พื้นที่ใต้กรามอลโตส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 323708 | 3156653 | 0.1025 |
| 4 | 571208 | 3033964 | 0.1883 |
| 6 | 1065396 | 3200773 | 0.3329 |
| 8 | 1484820 | 3201844 | 0.4637 |
| 10 | 2019990 | 3222936 | 0.6268 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่** ก.12 กราฟมาตรฐานของสารละลายมอลโตสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**การเตรียมสารละลาย Internal standard**

- เตรียมสารละลายกรดซิตริก 2% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดซิตริก 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Internal standard ของสารละลายมาตรฐานกรดอินทรีย์และสารละลายมาตรฐาน ABE แต่ละความเข้มข้น (อัตราส่วน standard 0.5 มิลลิลิตร : กรดซิตริก 2% 0.5 มิลลิลิตร)

- เตรียมสารละลาย (Stock) กลีเซอรอล 2% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปิเปตกลีเซอรอลเข้มข้น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Internal standard ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น (อัตราส่วน standard 0.5 มิลลิลิตร : กลีเซอรอล 2% 0.5 มิลลิลิตร)

**การเตรียมสารละลาย Mobile phase กรดซัลฟิวริก**

เตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 5 mM โดยออโต้ปิเปตต์กรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

# การวิเคราะห์ทางสถิติ

**ตารางที่ ข.1** การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก และ ไฮโดรคลอริก

**ตารางทดสอบผลกระทบระหว่างปัจจัยโดยตัวแปรตามเป็นน้ำตาล**

| แหล่ง | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 3891.017[a] | 29 | 134.173 | 322.372 | .000 |
| Intercept | 7671.656 | 1 | 7671.656 | 18432.369 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น*เวลา | 156.541 | 8 | 19.568 | 47.014 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น | 213.645 | 4 | 53.411 | 128.329 | .000 |
| ความเข้มข้น*เวลา | 288.036 | 8 | 36.004 | 86.506 | .000 |
| กรด*เวลา | 17.421 | 2 | 8.711 | 20.929 | .000 |
| กรด | 512.875 | 1 | 512.875 | 1232.263 | .000 |
| ความเข้มข้น | 2625.337 | 4 | 656.334 | 1576.947 | .000 |
| เวลา | 77.163 | 2 | 38.581 | 92.698 | .000 |
| ความคลาดเคลื่อน | 99.889 | 240 | .416 | | |
| ทั้งหมด | 11662.562 | 270 | | | |
| Corrected Total | 3990.906 | 269 | | | |

**ตารางแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ (LSD)**

| (ก) ความเข้มข้น | (ข) ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยความต่าง (ก-ข) | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | Sig. | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 0.1 | 0.08 | 3.912342* | .1241573 | .000 | 3.667765 | 4.156919 |
| | 0.06 | 5.193841* | .1241573 | .000 | 4.949264 | 5.438419 |
| | 0.04 | 7.610343* | .1241573 | .000 | 7.365766 | 7.854920 |
| | 0.02 | 8.959061* | .1241573 | .000 | 8.714484 | 9.203638 |
| 0.08 | 0.1 | -3.912342* | .1241573 | .000 | -4.156919 | -3.667765 |
| | 0.06 | 1.281499* | .1241573 | .000 | 1.036922 | 1.526076 |
| | 0.04 | 3.698001* | .1241573 | .000 | 3.453423 | 3.942578 |
| | 0.02 | 5.046719* | .1241573 | .000 | 4.802142 | 5.291296 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ (LSD) (ต่อ)

| (ก) ความเข้มข้น | (ข) ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยความต่าง (ก-ข) | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | Sig. | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 0.06 | 0.1 | -5.193841* | .1241573 | .000 | -5.438419 | -4.949264 |
| | 0.08 | -1.281499* | .1241573 | .000 | -1.526076 | -1.036922 |
| | 0.04 | 2.416501* | .1241573 | .000 | 2.171924 | 2.661078 |
| | 0.02 | 3.765220* | .1241573 | .000 | 3.520643 | 4.009797 |
| 0.04 | 0.1 | -7.610343* | .1241573 | .000 | -7.854920 | -7.365766 |
| | 0.08 | -3.698001* | .1241573 | .000 | -3.942578 | -3.453423 |
| | 0.06 | -2.416501* | .1241573 | .000 | -2.661078 | -2.171924 |
| | 0.02 | 1.348719* | .1241573 | .000 | 1.104142 | 1.593296 |
| 0.02 | 0.1 | -8.959061* | .1241573 | .000 | -9.203638 | -8.714484 |
| | 0.08 | -5.046719* | .1241573 | .000 | -5.291296 | -4.802142 |
| | 0.06 | -3.765220* | .1241573 | .000 | -4.009797 | -3.520643 |
| | 0.04 | -1.348719* | .1241573 | .000 | -1.593296 | -1.104142 |

ตารางแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเวลาอย่างมีนัยสำคัญ (LSD)

| (ก) เวลา | (ข) เวลา | ค่าเฉลี่ยความต่าง (ก-ข) | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | Sig. | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 10 | 20 | -1.056575* | .0961718 | .000 | -1.246024 | -.867127 |
| | 30 | .141623 | .0961718 | .142 | -.047826 | .331071 |
| 20 | 10 | 1.056575* | .0961718 | .000 | .867127 | 1.246024 |
| | 30 | 1.198198* | .0961718 | .000 | 1.008750 | 1.387647 |
| 30 | 10 | -.141623 | .0961718 | .142 | -.331071 | .047826 |
| | 20 | -1.198198* | .0961718 | .000 | -1.387647 | -1.008750 |

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกรด

| กรด | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| HCL | 6.709 | .056 | 6.599 | 6.818 |
| $H_2SO_4$ | 3.952 | .056 | 3.843 | 4.062 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น

| ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 0.1 | 10.466 | .088 | 10.293 | 10.638 |
| 0.08 | 6.553 | .088 | 6.380 | 6.726 |
| 0.06 | 5.272 | .088 | 5.099 | 5.445 |
| 0.04 | 2.855 | .088 | 2.682 | 3.028 |
| 0.02 | 1.506 | .088 | 1.334 | 1.679 |

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเวลา

| เวลา | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 10 | 5.025 | .068 | 4.891 | 5.159 |
| 20 | 6.082 | .068 | 5.948 | 6.216 |
| 30 | 4.884 | .068 | 4.750 | 5.018 |

**ตารางที่ ข.2** การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก และไฮโดรคลอริก

ทดสอบผลกระทบระหว่างปัจจัยตัวแปรตามเป็นโปรตีน

| แหล่ง | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 7611.439[a] | 29 | 262.463 | 312.609 | .000 |
| Intercept | 28194.735 | 1 | 28194.735 | 33581.603 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น*เวลา | 168.635 | 8 | 21.079 | 25.107 | .000 |
| กรด*ความเข้มข้น | 723.609 | 4 | 180.902 | 215.465 | .000 |
| ความเข้มข้น*เวลา | 282.592 | 8 | 35.324 | 42.073 | .000 |
| กรด* เวลา | 280.171 | 2 | 140.085 | 166.850 | .000 |
| กรด | 1564.815 | 1 | 1564.815 | 1863.787 | .000 |
| ความเข้มข้น | 4480.270 | 4 | 1120.067 | 1334.067 | .000 |
| เวลา | 111.347 | 2 | 55.674 | 66.311 | .000 |
| ความคลาดเคลื่อน | 201.501 | 240 | .840 | | |
| ทั้งหมด | 36007.675 | 270 | | | |
| Corrected Total | 7812.940 | 269 | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ (LSD)

| (ก) ความเข้มข้น | (ข) ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยความต่าง (ก-ข) | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | Sig. | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 0.1 | 0.08 | 5.88* | .176 | .000 | 5.54 | 6.23 |
| | 0.06 | 9.52* | .176 | .000 | 9.18 | 9.87 |
| | 0.04 | 10.34* | .176 | .000 | 9.99 | 10.69 |
| | 0.02 | 10.97* | .176 | .000 | 10.63 | 11.32 |
| 0.08 | 0.1 | -5.88* | .176 | .000 | -6.23 | -5.54 |
| | 0.06 | 3.64* | .176 | .000 | 3.29 | 3.99 |
| | 0.04 | 4.46* | .176 | .000 | 4.11 | 4.80 |
| | 0.02 | 5.09* | .176 | .000 | 4.74 | 5.44 |
| 0.06 | 0.1 | -9.52* | .176 | .000 | -9.87 | -9.18 |
| | 0.08 | -3.64* | .176 | .000 | -3.99 | -3.29 |
| | 0.04 | .81* | .176 | .000 | .47 | 1.16 |
| | 0.02 | 1.45* | .176 | .000 | 1.10 | 1.80 |
| 0.04 | 0.1 | -10.34* | .176 | .000 | -10.69 | -9.99 |
| | 0.08 | -4.46* | .176 | .000 | -4.80 | -4.11 |
| | 0.06 | -.81* | .176 | .000 | -1.16 | -.47 |
| | 0.02 | .64* | .176 | .000 | .29 | .98 |
| 0.02 | 0.1 | -10.97* | .176 | .000 | -11.32 | -10.63 |
| | 0.08 | -5.09* | .176 | .000 | -5.44 | -4.74 |
| | 0.06 | -1.45* | .176 | .000 | -1.80 | -1.10 |
| | 0.04 | -.64* | .176 | .000 | -.98 | -.29 |

ตารางแสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเวลาอย่างมีนัยสำคัญ (LSD)

| (ก) ความเข้มข้น | (ข) ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยความต่าง (ก-ข) | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | Sig. | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 10 | 20 | -1.37* | .137 | .000 | -1.64 | -1.11 |
| | 30 | -1.35* | .137 | .000 | -1.62 | -1.08 |
| 20 | 10 | 1.37* | .137 | .000 | 1.11 | 1.64 |
| | 30 | .02 | .137 | .857 | -.24 | .29 |
| 30 | 10 | 1.35* | .137 | .000 | 1.08 | 1.62 |
| | 20 | -.02 | .137 | .857 | -.29 | .24 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกรด

| กรด | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| HCL | 12.626 | .079 | 12.471 | 12.782 |
| $H_2SO_4$ | 7.811 | .079 | 7.656 | 7.967 |

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้น

| ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 0.1 | 17.563 | .125 | 17.317 | 17.808 |
| 0.08 | 11.680 | .125 | 11.435 | 11.926 |
| 0.06 | 8.039 | .125 | 7.793 | 8.284 |
| 0.04 | 7.225 | .125 | 6.979 | 7.470 |
| 0.02 | 6.588 | .125 | 6.342 | 6.834 |

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเวลา

| เวลา | ค่าเฉลี่ย | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน |
| 10 | 9.311 | .097 | 9.121 | 9.501 |
| 20 | 10.685 | .097 | 10.495 | 10.876 |
| 30 | 10.661 | .097 | 10.470 | 10.851 |

**ตารางที่ ข.3** การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 5.228 | 10 | .523 | 9.501 | .000 |
| Within Groups | 1.211 | 22 | .055 | | |
| Total | 6.439 | 32 | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 12 | 3 | 5.2533 | | | | | | |
| 24 | 3 | 5.4500 | 5.4500 | | | | | |
| 0 | 3 | 5.6267 | 5.6267 | 5.6267 | | | | |
| 120 | 3 | | 5.8033 | 5.8033 | 5.8033 | | | |
| 110 | 3 | | | 5.9500 | 5.9500 | 5.9500 | | |
| 72 | 3 | | | | 6.0700 | 6.0700 | 6.0700 | |
| 86 | 3 | | | | 6.1233 | 6.1233 | 6.1233 | |
| 96 | 3 | | | | | 6.2800 | 6.2800 | 6.2800 |
| 38 | 3 | | | | | 6.2967 | 6.2967 | 6.2967 |
| 48 | 3 | | | | | | 6.4300 | 6.4300 |
| 62 | 3 | | | | | | | 6.5767 |
| Sig. | | .077 | .094 | .124 | .139 | .117 | .104 | .169 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | 5.6267 | .04509 | .02603 | 5.5147 | 5.7387 | 5.58 | 5.67 | |
| 12 | 3 | 5.2533 | .03055 | .01764 | 5.1774 | 5.3292 | 5.22 | 5.28 | |
| 24 | 3 | 5.4500 | .19468 | .11240 | 4.9664 | 5.9336 | 5.30 | 5.67 | |
| 38 | 3 | 6.2967 | .19858 | .11465 | 5.8034 | 6.7900 | 6.07 | 6.44 | |
| 48 | 3 | 6.4300 | .13454 | .07767 | 6.0958 | 6.7642 | 6.32 | 6.58 | |
| 62 | 3 | 6.5767 | .13577 | .07839 | 6.2394 | 6.9139 | 6.45 | 6.72 | |
| 72 | 3 | 6.0700 | .00000 | .00000 | 6.0700 | 6.0700 | 6.07 | 6.07 | |
| 86 | 3 | 6.1233 | .38031 | .21957 | 5.1786 | 7.0681 | 5.82 | 6.55 | |
| 96 | 3 | 6.2800 | .20518 | .11846 | 5.7703 | 6.7897 | 6.08 | 6.49 | |
| 110 | 3 | 5.9500 | .37242 | .21502 | 5.0248 | 6.8752 | 5.66 | 6.37 | |
| 120 | 3 | 5.8033 | .40377 | .23312 | 4.8003 | 6.8064 | 5.36 | 6.15 | |
| Total | 33 | 5.9873 | .44857 | .07809 | 5.8282 | 6.1463 | 5.22 | 6.72 | |
| Model Fixed Effects | | | .23458 | .04083 | 5.9026 | 6.0720 | | | |
| Random Effects | | | | .12587 | 5.7068 | 6.2677 | | | .15593 |

**ตารางที่ ข.4** การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3.116 | 10 | .312 | 67.113 | .000 |
| Within Groups | .102 | 22 | .005 | | |
| Total | 3.218 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | 3 | 4.6733 | | | | | |
| 24 | 3 | | 4.9300 | | | | |
| 14 | 3 | | 4.9400 | | | | |
| 48 | 3 | | | 5.1100 | | | |
| 96 | 3 | | | 5.1133 | | | |
| 38 | 3 | | | 5.1233 | | | |
| 110 | 3 | | | 5.1300 | | | |
| 62 | 3 | | | | 5.2500 | | |
| 120 | 3 | | | | 5.2867 | | |
| 86 | 3 | | | | | 5.5000 | |
| 72 | 3 | | | | | | 5.9067 |
| Sig. | | 1.000 | .859 | .746 | .517 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | 4.6733 | .03215 | .01856 | 4.5935 | 4.7532 | 4.65 | 4.71 | |
| 12 | 3 | 4.9400 | .01000 | .00577 | 4.9152 | 4.9648 | 4.93 | 4.95 | |
| 24 | 3 | 4.9300 | .10392 | .06000 | 4.6718 | 5.1882 | 4.81 | 4.99 | |
| 38 | 3 | 5.1233 | .07767 | .04485 | 4.9304 | 5.3163 | 5.06 | 5.21 | |
| 48 | 3 | 5.1100 | .07000 | .04041 | 4.9361 | 5.2839 | 5.06 | 5.19 | |
| 62 | 3 | 5.2500 | .05292 | .03055 | 5.1186 | 5.3814 | 5.21 | 5.31 | |
| 72 | 3 | 5.9067 | .05686 | .03283 | 5.7654 | 6.0479 | 5.86 | 5.97 | |
| 86 | 3 | 5.5000 | .05568 | .03215 | 5.3617 | 5.6383 | 5.45 | 5.56 | |
| 96 | 3 | 5.1133 | .03215 | .01856 | 5.0335 | 5.1932 | 5.09 | 5.15 | |
| 110 | 3 | 5.1300 | .10000 | .05774 | 4.8816 | 5.3784 | 5.03 | 5.23 | |
| 120 | 3 | 5.2867 | .08963 | .05175 | 5.0640 | 5.5093 | 5.23 | 5.39 | |
| Total | 33 | 5.1785 | .31711 | .05520 | 5.0660 | 5.2909 | 4.65 | 5.97 | |
| Model Fixed Effects | | | .06814 | .01186 | 5.1539 | 5.2031 | | | |
| Random Effects | | | | .09717 | 4.9620 | 5.3950 | | | .10231 |

**ตารางที่ ข.5** การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 8.742 | 10 | .874 | 10.791 | .000 |
| Within Groups | 1.782 | 22 | .081 | | |
| Total | 10.524 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| | 3 | .2633 | | |
| 62 | 3 | | 1.0133 | |
| 12 | 3 | | 1.1367 | |
| 110 | 3 | | 1.1467 | |
| 96 | 3 | | 1.1633 | |
| 72 | 3 | | 1.2200 | |
| 86 | 3 | | 1.3433 | |
| 38 | 3 | | 1.3467 | |
| 24 | 3 | | 1.4367 | |
| 48 | 3 | | 1.5533 | |
| 120 | 3 | | | 2.5633 |
| Sig. | | 1.000 | .056 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | .2633 | .10263 | .05925 | .0084 | .5183 | .15 | .35 | |
| 12 | 3 | 1.1367 | .13204 | .07623 | .8087 | 1.4647 | 1.02 | 1.28 | |
| 24 | 3 | 1.4367 | .19732 | .11392 | .9465 | 1.9268 | 1.21 | 1.57 | |
| 38 | 3 | 1.3467 | .57761 | .33348 | -.0882 | 2.7815 | .74 | 1.89 | |
| 48 | 3 | 1.5533 | .43662 | .25208 | .4687 | 2.6379 | 1.05 | 1.83 | |
| 62 | 3 | 1.0133 | .14468 | .08353 | .6539 | 1.3727 | .92 | 1.18 | |
| 72 | 3 | 1.2200 | .22113 | .12767 | .6707 | 1.7693 | .97 | 1.39 | |
| 86 | 3 | 1.3433 | .07234 | .04177 | 1.1636 | 1.5230 | 1.26 | 1.39 | |
| 96 | 3 | 1.1633 | .22008 | .12706 | .6166 | 1.7100 | .94 | 1.38 | |
| 110 | 3 | 1.1467 | .14154 | .08172 | .7951 | 1.4983 | 1.06 | 1.31 | |
| 120 | 3 | 2.5633 | .39552 | .22835 | 1.5808 | 3.5459 | 2.12 | 2.88 | |
| Total | 33 | 1.2897 | .57347 | .09983 | 1.0864 | 1.4930 | .15 | 2.88 | |
| Model Fixed Effects | | | .28463 | .01186 | 1.1869 | 1.3925 | | | |
| Random Effects | | | | .16276 | .9271 | 1.6523 | | | .26438 |

**ตารางที่ ข.6** การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 15.638 | 10 | 1.564 | 17.096 | .000 |
| Within Groups | 2.012 | 22 | .091 | | |
| Total | 17.650 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | 3 | .5633 | | | | |
| 14 | 3 | .8600 | .8600 | | | |
| 24 | 3 | | 1.1433 | | | |
| 48 | 3 | | 1.1833 | | | |
| 72 | 3 | | 1.3433 | 1.3433 | | |
| 62 | 3 | | | 1.7667 | 1.7667 | |
| 86 | 3 | | | 1.8533 | 1.8533 | |
| 96 | 3 | | | 1.8700 | 1.8700 | |
| 110 | 3 | | | | 1.9167 | |
| 38 | 3 | | | | 2.0233 | |
| 120 | 3 | | | | | 3.2433 |
| Sig. | | .242 | .085 | .062 | .362 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | .5633 | .11240 | .06489 | .2841 | .8425 | .44 | .66 | |
| 12 | 3 | .8600 | .26851 | .15503 | .1930 | 1.5270 | .55 | 1.02 | |
| 24 | 3 | 1.1433 | .50292 | .29036 | -.1060 | 2.3927 | .57 | 1.51 | |
| 38 | 3 | 2.0233 | .08622 | .04978 | 1.8092 | 2.2375 | 1.93 | 2.10 | |
| 48 | 3 | 1.1833 | .13204 | .07623 | .8553 | 1.5113 | 1.04 | 1.30 | |
| 62 | 3 | 1.7667 | .00577 | .00333 | 1.7523 | 1.7810 | 1.76 | 1.77 | |
| 72 | 3 | 1.3433 | .79324 | .45798 | -.6272 | 3.3139 | .43 | 1.86 | |
| 86 | 3 | 1.8533 | .02309 | .01333 | 1.7960 | 1.9107 | 1.84 | 1.88 | |
| 96 | 3 | 1.8700 | .08718 | .05033 | 1.6534 | 2.0866 | 1.81 | 1.97 | |
| 110 | 3 | 1.9167 | .02082 | .01202 | 1.8650 | 1.9684 | 1.90 | 1.94 | |
| 120 | 3 | 3.2433 | .07638 | .04410 | 3.0536 | 3.4331 | 3.16 | 3.31 | |
| Total | 33 | 1.6152 | .74268 | .12928 | 1.3518 | 1.8785 | .43 | 3.31 | |
| Model Fixed Effects | | | .30244 | .05265 | 1.5060 | 1.7243 | | | |
| Random Effects | | | | .21769 | 1.1301 | 2.1002 | | | .49078 |

**ตารางที่ ข.7** การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3197.312 | 10 | 319.731 | 270.530 | .000 |
| Within Groups | 26.001 | 22 | 1.182 | | |
| Total | 3223.313 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 86 | 3 | 19.1944 | | | | | |
| 120 | 3 | 20.0138 | | | | | |
| 62 | 3 | 20.9583 | | | | | |
| 110 | 3 | | 23.4027 | | | | |
| 48 | 3 | | 24.7916 | 24.7916 | | | |
| 96 | 3 | | 25.1805 | 25.1805 | | | |
| 72 | 3 | | | 26.4860 | | | |
| 38 | 3 | | | | 28.7360 | | |
| 24 | 3 | | | | | 37.7916 | |
| 12 | 3 | | | | | | 47.2083 |
| 0 | 3 | | | | | | 47.5971 |
| Sig. | | .072 | .070 | .083 | 1.000 | 1.000 | .666 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | 47.5971 | 1.07152 | .61864 | 44.9353 | 50.2589 | 46.37 | 48.37 | |
| 12 | | 3 | 47.2083 | 1.01379 | .58531 | 44.6898 | 49.7267 | 46.54 | 48.37 | |
| 24 | | 3 | 37.7916 | 1.74005 | 1.00462 | 33.4691 | 42.1141 | 35.79 | 38.96 | |
| 38 | | 3 | 28.7360 | 1.71661 | .99109 | 24.4717 | 33.0003 | 27.12 | 30.54 | |
| 48 | | 3 | 24.7916 | .38188 | .22048 | 23.8429 | 25.7402 | 24.37 | 25.12 | |
| 62 | | 3 | 20.9583 | .29167 | .16839 | 20.2337 | 21.6828 | 20.75 | 21.29 | |
| 72 | | 3 | 26.4860 | .89106 | .51445 | 24.2725 | 28.6995 | 25.46 | 27.04 | |
| 86 | | 3 | 19.1944 | 1.43271 | .82718 | 15.6353 | 22.7534 | 17.54 | 20.08 | |
| 96 | | 3 | 25.1805 | .63783 | .36825 | 23.5960 | 26.7649 | 24.79 | 25.92 | |
| 110 | | 3 | 23.4027 | 1.14134 | .65895 | 20.5674 | 26.2379 | 22.17 | 24.42 | |
| 120 | | 3 | 20.0138 | .25115 | .14500 | 19.3899 | 20.6377 | 19.75 | 20.25 | |
| Total | | 33 | .113115 | .0321894 | .0056034 | .101701 | .124529 | .0590 | .1942 | |
| Model | Fixed Effects | | | 1.08714 | .18925 | 28.8221 | 29.6070 | | | |
| | Random Effects | | | | 3.11269 | 22.2791 | 36.1501 | | | 106.18310 |

**ตารางที่ ข.8** การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 3859.648 | 10 | 385.965 | 101.484 | .000 |
| Within Groups | 83.671 | 22 | 3.803 | | |
| Total | 3943.319 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 110 | 3 | 15.0333 | | | | | | |
| 96 | 3 | | 18.5333 | | | | | |
| 72 | 3 | | 20.0110 | | | | | |
| 120 | 3 | | 21.1666 | | | | | |
| 86 | 3 | | 21.5277 | | | | | |
| 62 | 3 | | | 25.8444 | | | | |
| 48 | 3 | | | | 29.9860 | | | |
| 38 | 3 | | | | | 35.6805 | | |
| 24 | 3 | | | | | | 42.2360 | |
| 14 | 3 | | | | | | 44.1527 | 44.1527 |
| 0 | 3 | | | | | | | 47.0000 |
| Sig. | | 1.000 | .097 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | .241 | .088 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | 47.0000 | .00000 | .00000 | 47.0000 | 47.0000 | 47.00 | 47.00 | |
| 12 | 3 | 44.1527 | 2.19528 | 1.26745 | 38.6993 | 49.6061 | 41.64 | 45.71 | |
| 24 | 3 | 42.2360 | 1.78795 | 1.03227 | 37.7945 | 46.6775 | 41.04 | 44.29 | |
| 38 | 3 | 35.6805 | 3.76970 | 2.17644 | 26.3160 | 45.0449 | 31.46 | 38.71 | |
| 48 | 3 | 29.9860 | 3.04404 | 1.75748 | 22.4242 | 37.5479 | 26.87 | 32.96 | |
| 62 | 3 | 25.8444 | 1.27979 | .73889 | 22.6652 | 29.0235 | 24.83 | 27.28 | |
| 72 | 3 | 20.0110 | .39707 | .22925 | 19.0247 | 20.9974 | 19.70 | 20.46 | |
| 86 | 3 | 21.5277 | .43782 | .25278 | 20.4401 | 22.6153 | 21.27 | 22.03 | |
| 96 | 3 | 18.5333 | 1.90188 | 1.09805 | 13.8087 | 23.2578 | 16.55 | 20.34 | |
| 110 | 3 | 15.0333 | 1.97560 | 1.14061 | 10.1256 | 19.9409 | 13.46 | 17.25 | |
| 120 | 3 | 21.1666 | .91382 | .52759 | 18.8965 | 23.4366 | 20.12 | 21.83 | |
| Total | 33 | 29.1974 | 11.10084 | 1.93241 | 25.2612 | 33.1336 | 13.46 | 47.00 | |
| Fixed Effects | | | 1.95018 | .33948 | 28.4934 | 29.9014 | | | |
| Random Effects | | | | 3.41993 | 21.5773 | 36.8175 | | | 127.38720 |

**ตารางที่ ข.9** การวิเคราะห์สถิติความเข้มข้นอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 38.730 | 10 | 3.873 | 236.448 | .000 |
| Within Groups | .360 | 22 | .016 | | |
| Total | 39.090 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 3 | .000000 | | | | |
| 12 | 3 | .000000 | | | | |
| 24 | 3 | .000000 | | | | |
| 38 | 3 | .224100 | | | | |
| 72 | 3 | | 1.143962 | | | |
| 48 | 3 | | 1.161367 | | | |
| 62 | 3 | | 1.178089 | | | |
| 86 | 3 | | 1.217269 | | | |
| 96 | 3 | | | 2.364169 | | |
| 110 | 3 | | | | 2.754583 | |
| 120 | 3 | | | | | 3.164722 |
| Sig. | | .060 | .529 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 12 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 24 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 38 | | 3 | .224100 | .0389486 | .0224870 | .127346 | .320853 | .1818 | .2585 | |
| 48 | | 3 | 1.161367 | .1879253 | .1084987 | .694534 | 1.628199 | .9812 | 1.3562 | |
| 62 | | 3 | 1.178089 | .0468925 | .0270734 | 1.061601 | 1.294576 | 1.1300 | 1.2237 | |
| 72 | | 3 | 1.143962 | .0186120 | .0107456 | 1.097728 | 1.190197 | 1.1229 | 1.1583 | |
| 86 | | 3 | 1.217269 | .1214606 | .0701253 | .915544 | 1.518994 | 1.0792 | 1.3075 | |
| 96 | | 3 | 2.364169 | .0577526 | .0333435 | 2.220704 | 2.507635 | 2.3240 | 2.4303 | |
| 110 | | 3 | 2.754583 | .3395754 | .1960539 | 1.911031 | 3.598135 | 2.4292 | 3.1068 | |
| 120 | | 3 | 3.164722 | .0860281 | .0496684 | 2.951017 | 3.378428 | 3.0841 | 3.2553 | |
| Total | | 33 | 1.200751 | 1.1052457 | .1923986 | .808848 | 1.592654 | .0000 | 3.2553 | |
| Model | Fixed Effects | | | .1279839 | .0222791 | 1.154547 | 1.246955 | | | |
| | Random Effects | | | | .3425830 | .437429 | 1.964073 | | | 1.2855340 |

**ตารางที่ ข.10** การวิเคราะห์ทางสถิติของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 57.735 | 10 | 5.774 | 112.556 | .000 |
| Within Groups | 1.026 | 20 | .051 | | |
| Total | 58.761 | 30 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 0 | 3 | .000000 | | | | |
| 12 | 3 | .000000 | | | | |
| 24 | 3 | .418593 | | | | |
| 38 | 3 | | 1.437986 | | | |
| 72 | 3 | | | 2.711684 | | |
| 48 | 3 | | | 2.951496 | 2.951496 | |
| 62 | 3 | | | 3.024052 | 3.024052 | 3.024052 |
| 86 | 3 | | | 3.107788 | 3.107788 | 3.107788 |
| 96 | 3 | | | | 3.308323 | 3.308323 |
| 110 | 3 | | | | 3.317102 | 3.317102 |
| 120 | 3 | | | | | 3.425618 |
| Sig. | | .052 | 1.000 | .073 | .103 | .075 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 2 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 12 | | 2 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 24 | | 2 | .418593 | .3730082 | .2153564 | -.508011 | 1.345196 | .0000 | .7158 | |
| 38 | | 2 | 1.437986 | .1537052 | .1086860 | .057000 | 2.818972 | 1.3293 | 1.5467 | |
| 48 | | 2 | 2.711684 | .0949172 | .0548005 | 2.475896 | 2.947471 | 2.6068 | 2.7917 | |
| 62 | | 2 | 2.951496 | .0255866 | .0147724 | 2.887936 | 3.015057 | 2.9228 | 2.9721 | |
| 72 | | 2 | 3.107788 | .2007949 | .1419834 | 1.303718 | 4.911859 | 2.9658 | 3.2498 | |
| 86 | | 2 | 3.425618 | .0660379 | .0381270 | 3.261571 | 3.589665 | 3.3497 | 3.4698 | |
| 96 | | 2 | 3.024052 | .5548407 | .3203374 | 1.645752 | 4.402353 | 2.3934 | 3.4373 | |
| 110 | | 2 | 3.308323 | .0938223 | .0541683 | 3.075255 | 3.541390 | 3.2011 | 3.3752 | |
| 120 | | 2 | 3.317102 | .1056637 | .0610050 | 3.054619 | 3.579586 | 3.2247 | 3.4323 | |
| Total | | 22 | 2.147166 | 1.3995391 | .2513646 | 1.633811 | 2.660521 | .0000 | 3.4698 | |
| Model | Fixed Effects | | | .2264835 | .0406776 | 2.062314 | 2.232018 | | | |
| | Random Effects | | | | .4359513 | 1.175806 | 3.118526 | | | 2.0342841 |

**ตารางที่ ข.11** การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 476.601 | 10 | 47.660 | 141.417 | .000 |
| Within Groups | 7.414 | 22 | .337 | | |
| Total | 484.015 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0 | 3 | .6591 | | | | | | |
| 12 | 3 | | 2.4108 | | | | | |
| 24 | 3 | | | 5.3994 | | | | |
| 48 | 3 | | | | 9.3969 | | | |
| 38 | 3 | | | | 9.4015 | | | |
| 62 | 3 | | | | 10.2649 | 10.2649 | | |
| 72 | 3 | | | | | 10.7080 | 10.7080 | |
| 96 | 3 | | | | | 11.2688 | 11.2688 | 11.2688 |
| 86 | 3 | | | | | | 11.5827 | 11.5827 |
| 110 | 3 | | | | | | | 11.7920 |
| 120 | 3 | | | | | | | 12.1464 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | .096 | .056 | .094 | .103 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .659135 | .0659771 | .0380919 | .495239 | .823031 | .5868 | .7160 | |
| 12 | | 3 | 2.410836 | .2107477 | .1216753 | 1.887309 | 2.934362 | 2.1900 | 2.6098 | |
| 24 | | 3 | 5.399432 | .5689640 | .3284915 | 3.986047 | 6.812817 | 4.7767 | 5.8921 | |
| 38 | | 3 | 9.401545 | .2767433 | .1597778 | 8.714077 | 10.089014 | 9.1047 | 9.6524 | |
| 48 | | 3 | 9.396881 | .1091452 | .0630150 | 9.125749 | 9.668013 | 9.3115 | 9.5199 | |
| 62 | | 3 | 10.264862 | .1881336 | .1086190 | 9.797512 | 10.732211 | 10.0670 | 10.4415 | |
| 72 | | 3 | 10.707927 | .1341551 | .0774545 | 10.374667 | 11.041187 | 10.5846 | 10.8507 | |
| 86 | | 3 | 11.582660 | .3183519 | .1838005 | 10.791830 | 12.373490 | 11.3012 | 11.9282 | |
| 96 | | 3 | 11.268797 | 1.1183603 | .6456856 | 8.490636 | 14.046958 | 10.1413 | 12.3778 | |
| 110 | | 3 | 11.791974 | 1.3547016 | .7821373 | 8.426709 | 15.157240 | 10.8530 | 13.3450 | |
| 120 | | 3 | 12.146417 | .0744199 | .0429663 | 11.961548 | 12.331286 | 12.0726 | 12.2215 | |
| Total | | 33 | 8.639133 | 3.8891493 | .6770140 | 7.260101 | 10.018166 | .5868 | 13.3450 | |
| Model | Fixed Effects | | | .5805336 | .1010579 | 8.429552 | 8.848715 | | | |
| | Random Effects | | | | 1.2017677 | 5.961428 | 11.316838 | | | 15.7743610 |

**ตารางที่ ข.12** การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

**ตาราง ANOVA**

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 463.686 | 10 | 46.369 | 112.385 | .000 |
| Within Groups | 8.664 | 21 | .413 | | |
| Total | 472.351 | 31 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0 | 2 | .6961 | | | | | | |
| 12 | 2 | 1.1483 | 1.1483 | | | | | |
| 24 | 2 | | 1.9348 | | | | | |
| 38 | 2 | | | 5.5069 | | | | |
| 48 | 2 | | | | 7.0952 | | | |
| 62 | 2 | | | | | 8.5483 | | |
| 72 | 2 | | | | | 9.3676 | 9.3676 | |
| 96 | 2 | | | | | 9.6120 | 9.6119 | 9.6119 |
| 110 | 2 | | | | | | 10.4352 | 10.4352 |
| 86 | 2 | | | | | | 10.5216 | 10.5216 |
| 120 | 2 | | | | | | | 10.8034 |
| Sig. | | .409 | .157 | 1.000 | 1.000 | .073 | .060 | .053 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 2 | .696066 | .1216593 | .0702400 | .393848 | .998285 | .5917 | .8297 | |
| 12 | | 2 | 1.148311 | .0739126 | .0426735 | .964702 | 1.331920 | 1.0680 | 1.2135 | |
| 24 | | 2 | 1.934831 | .5507532 | .3179775 | .566684 | 3.302978 | 1.4955 | 2.5527 | |
| 38 | | 2 | 5.506874 | .2610814 | .1846124 | 3.161150 | 7.852597 | 5.3223 | 5.6915 | |
| 48 | | 2 | 7.095233 | .2542444 | .1467881 | 6.463655 | 7.726812 | 6.8379 | 7.3462 | |
| 62 | | 2 | 8.548264 | .1933852 | .1116510 | 8.067869 | 9.028660 | 8.3273 | 8.6868 | |
| 72 | | 2 | 9.367613 | .5824548 | .3362805 | 7.920715 | 10.814511 | 8.9946 | 10.0388 | |
| 86 | | 2 | 10.521643 | .2811976 | .1623495 | 9.823110 | 11.220177 | 10.2246 | 10.7838 | |
| 96 | | 2 | 9.611976 | 1.7892258 | 1.0330100 | 5.167293 | 14.056660 | 7.6539 | 11.1617 | |
| 110 | | 2 | 10.435226 | .2408843 | .1390746 | 9.836836 | 11.033616 | 10.2606 | 10.7100 | |
| 120 | | 2 | 10.803436 | .4413496 | .2548133 | 9.707063 | 11.899809 | 10.3830 | 11.2631 | |
| Total | | 22 | 6.921923 | 3.9034753 | .6900435 | 5.514570 | 8.329276 | .5917 | 11.2631 | |
| Model | Fixed Effects | | | .6423308 | .1135491 | 6.685785 | 7.158062 | | | |
| | Random Effects | | | | 1.2101496 | 4.225542 | 9.618305 | | | 15.8128326 |

**ตารางที่ ข.13** การวิเคราะห์ทางสถิติของเอทานอลที่จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | .028 | 10 | .003 | 12.779 | .000 |
| Within Groups | .005 | 22 | .000 | | |
| Total | .033 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 12 | 3 | .065726 | | | | | |
| 0 | 3 | .069201 | | | | | |
| 24 | 3 | .089887 | .089887 | | | | |
| 110 | 3 | | .097822 | .097822 | | | |
| 120 | 3 | | .103597 | .103597 | .103597 | | |
| 62 | 3 | | | .118107 | .118107 | | |
| 48 | 3 | | | .121397 | .121397 | .121397 | |
| 38 | 3 | | | | .129567 | .129567 | .129567 |
| 86 | 3 | | | | | .145976 | .145976 |
| 96 | 3 | | | | | | .150699 |
| 72 | 3 | | | | | | .152284 |
| Sig. | | .072 | .298 | .088 | .061 | .067 | .099 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .069201 | .0016361 | .0009446 | .065136 | .073265 | .0673 | .0704 | |
| 12 | | 3 | .065726 | .0090270 | .0052117 | .043302 | .088150 | .0590 | .0760 | |
| 24 | | 3 | .089887 | .0051882 | .0029954 | .076999 | .102776 | .0840 | .0940 | |
| 38 | | 3 | .129567 | .0082993 | .0047916 | .108950 | .150183 | .1202 | .1362 | |
| 48 | | 3 | .121397 | .0230768 | .0133234 | .064071 | .178723 | .1060 | .1479 | |
| 62 | | 3 | .118107 | .0027694 | .0015989 | .111228 | .124987 | .1150 | .1201 | |
| 72 | | 3 | .152284 | .0060116 | .0034708 | .137350 | .167218 | .1467 | .1587 | |
| 86 | | 3 | .145976 | .0068839 | .0039744 | .128876 | .163077 | .1407 | .1538 | |
| 96 | | 3 | .150699 | .0393795 | .0227358 | .052875 | .248523 | .1175 | .1942 | |
| 110 | | 3 | .097822 | .0067984 | .0039251 | .080933 | .114710 | .0920 | .1053 | |
| 120 | | 3 | .103597 | .0058599 | .0033832 | .089040 | .118154 | .0995 | .1103 | |
| Total | | 33 | .113115 | .0321894 | .0056034 | .101701 | .124529 | .0590 | .1942 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0148783 | .0025900 | .107743 | .118486 | | | |
| | Random Effects | | | | .0092584 | .092486 | .133744 | | | .0008691 |

**ตารางที่ ข.14** การวิเคราะห์ทางสถิติของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | .408 | 10 | .041 | 26.521 | .000 |
| Within Groups | .032 | 21 | .002 | | |
| Total | .440 | 31 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 24 | 3 | .041573 | | | |
| 12 | 3 | .053172 | | | |
| 0 | 3 | .057849 | | | |
| 72 | 3 | | .237053 | | |
| 38 | 2 | | .267811 | .267811 | |
| 48 | 3 | | .268128 | .268128 | |
| 120 | 3 | | .274194 | .274194 | |
| 62 | 3 | | .292789 | .292789 | |
| 110 | 3 | | .298163 | .298163 | .298163 |
| 96 | 3 | | | .319228 | .319228 |
| 86 | 3 | | | | .367574 |
| Sig. | | .644 | .112 | .178 | .056 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .057849 | .0020320 | .0011732 | .052801 | .062897 | .0563 | .0601 | |
| 12 | | 3 | .053172 | .0025945 | .0014980 | .046727 | .059618 | .0507 | .0558 | |
| 24 | | 3 | .041573 | .0080357 | .0046394 | .021612 | .061535 | .0360 | .0508 | |
| 38 | | 2 | .267811 | .0104819 | .0074119 | .173634 | .361988 | .2604 | .2752 | |
| 48 | | 3 | .268128 | .0128294 | .0074071 | .236258 | .299998 | .2550 | .2807 | |
| 62 | | 3 | .292789 | .0050713 | .0029279 | .280191 | .305387 | .2890 | .2985 | |
| 72 | | 3 | .237053 | .1138129 | .0657099 | -.045674 | .519780 | .1074 | .3207 | |
| 86 | | 3 | .367574 | .0182784 | .0105530 | .322168 | .412980 | .3558 | .3886 | |
| 96 | | 3 | .319228 | .0342782 | .0197905 | .234076 | .404379 | .2833 | .3515 | |
| 110 | | 3 | .298163 | .0356189 | .0205646 | .209680 | .386645 | .2597 | .3300 | |
| 120 | | 3 | .274194 | .0094371 | .0054485 | .250751 | .297638 | .2634 | .2809 | |
| Total | | 32 | .223900 | .1191335 | .0210600 | .180948 | .266852 | .0360 | .3886 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0392075 | .0069310 | .209486 | .238314 | | | |
| | Random Effects | | | | .0358780 | .143959 | .303841 | | | .0134993 |

**ตารางที่ ข.15** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 4.749 | 10 | .475 | 31.300 | .000 |
| Within Groups | .334 | 22 | .015 | | |
| Total | 5.082 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 48 | 3 | 1.332119 | | | |
| 62 | 3 | 1.395988 | | | |
| 38 | 3 | 1.460922 | | | |
| 24 | 3 | 1.505645 | | | |
| 72 | 3 | | 1.716204 | | |
| 86 | 3 | | 1.822406 | | |
| 96 | 3 | | 1.825968 | | |
| 12 | 3 | | 1.841857 | 1.841857 | |
| 110 | 3 | | 1.940917 | 1.940917 | |
| 120 | 3 | | | 2.058424 | |
| 0 | 3 | | | | 2.751076 |
| Sig. | | .127 | .056 | .052 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | 2.751076 | .1495999 | .0863716 | 2.379449 | 3.122703 | 2.5832 | 2.8704 | |
| 12 | | 3 | 1.841857 | .0976601 | .0563841 | 1.599256 | 2.084458 | 1.7332 | 1.9224 | |
| 24 | | 3 | 1.505645 | .2321439 | .1340283 | .928968 | 2.082323 | 1.2377 | 1.6448 | |
| 38 | | 3 | 1.460922 | .1139910 | .0658127 | 1.177753 | 1.744092 | 1.3529 | 1.5801 | |
| 48 | | 3 | 1.332119 | .0530715 | .0306409 | 1.200282 | 1.463956 | 1.2937 | 1.3927 | |
| 62 | | 3 | 1.395988 | .0442452 | .0255450 | 1.286077 | 1.505900 | 1.3616 | 1.4459 | |
| 72 | | 3 | 1.716204 | .0221821 | .0128069 | 1.661100 | 1.771307 | 1.6932 | 1.7374 | |
| 86 | | 3 | 1.822406 | .0095517 | .0055147 | 1.798679 | 1.846134 | 1.8114 | 1.8288 | |
| 96 | | 3 | 1.825968 | .1818668 | .1050008 | 1.374186 | 2.277750 | 1.6601 | 2.0204 | |
| 110 | | 3 | 1.940917 | .1683289 | .0971847 | 1.522765 | 2.359069 | 1.7937 | 2.1244 | |
| 120 | | 3 | 2.058424 | .0362917 | .0209530 | 1.968271 | 2.148578 | 2.0367 | 2.1003 | |
| Total | | 33 | 1.786503 | .3985301 | .0693752 | 1.645190 | 1.927815 | 1.2377 | 2.8704 | |
| Model | Fixed Effects | | | .1231729 | .0214416 | 1.742035 | 1.830970 | | | |
| | Random Effects | | | | .1199579 | 1.519220 | 2.053785 | | | .1532317 |

**ตารางที่ ข.16** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

**ตาราง ANOVA**

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 13.531 | 10 | 1.353 | 37.388 | .000 |
| Within Groups | .760 | 21 | .036 | | |
| Total | 14.291 | 31 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 86 | 3 | .408926 | | | | |
| 96 | 3 | .420882 | .420882 | | | |
| 62 | 3 | .429381 | .429381 | | | |
| 110 | 3 | .456211 | .456211 | | | |
| 120 | 3 | .488980 | .488980 | | | |
| 72 | 3 | .730597 | .730597 | | | |
| 48 | 3 | | .786608 | | | |
| 38 | 2 | | | 1.130914 | | |
| 24 | 3 | | | 1.147123 | | |
| 12 | 3 | | | | 1.885149 | |
| 0 | 3 | | | | | 2.434405 |
| Sig. | | .086 | .053 | .920 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | 2.434405 | .0765804 | .0442137 | 2.244168 | 2.624641 | 2.3474 | 2.4916 | |
| 12 | | 3 | 1.885149 | .0468583 | .0270536 | 1.768746 | 2.001551 | 1.8491 | 1.9381 | |
| 24 | | 3 | 1.147123 | .2062142 | .1190578 | .634858 | 1.659387 | .9315 | 1.3425 | |
| 38 | | 2 | 1.130914 | .0646279 | .0456988 | .550255 | 1.711572 | 1.0852 | 1.1766 | |
| 48 | | 3 | .786608 | .0304056 | .0175547 | .711076 | .862139 | .7540 | .8141 | |
| 62 | | 3 | .429381 | .0965823 | .0557618 | .189457 | .669305 | .3328 | .5259 | |
| 72 | | 3 | .730597 | .5595712 | .3230686 | -.659455 | 2.120649 | .4012 | 1.3767 | |
| 86 | | 3 | .408926 | .0262786 | .0151720 | .343646 | .474206 | .3807 | .4327 | |
| 96 | | 3 | .420882 | .0168547 | .0097310 | .379013 | .462752 | .4033 | .4369 | |
| 110 | | 3 | .456211 | .0333583 | .0192594 | .373344 | .539078 | .4316 | .4942 | |
| 120 | | 3 | .488980 | .0431032 | .0248856 | .381906 | .596054 | .4392 | .5147 | |
| Total | | 32 | .932082 | .6789587 | .1200241 | .687291 | 1.176872 | .3328 | 2.4916 | |
| Model | Fixed Effects | | | .1902356 | .0336292 | .862146 | 1.002017 | | | |
| | Random Effects | | | | .2067014 | .471522 | 1.392641 | | | .4531150 |

**ตารางที่ ข.17** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดบิวทิริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 21.244 | 10 | 2.124 | 18.799 | .000 |
| Within Groups | 2.486 | 22 | .113 | | |
| Total | 23.730 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 96 | 3 | .000000 | | | | |
| 110 | 3 | .000000 | | | | |
| 120 | 3 | .000000 | | | | |
| 0 | 3 | .517022 | .517022 | | | |
| 38 | 3 | | 1.048420 | 1.048420 | | |
| 48 | 3 | | 1.064817 | 1.064817 | | |
| 62 | 3 | | | 1.458105 | 1.458105 | |
| 86 | 3 | | | 1.470893 | 1.470893 | |
| 24 | 3 | | | 1.556169 | 1.556169 | |
| 72 | 3 | | | | 1.909257 | |
| 12 | 3 | | | | | 2.516692 |
| Sig. | | .097 | .071 | .110 | .145 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .517022 | .0250685 | .0144733 | .454749 | .579296 | .4910 | .5410 | |
| 12 | | 3 | 2.516692 | .1681608 | .0970877 | 2.098958 | 2.934427 | 2.3226 | 2.6175 | |
| 24 | | 3 | 1.556169 | .9206725 | .5315505 | -.730909 | 3.843246 | .5569 | 2.3701 | |
| 38 | | 3 | 1.048420 | .1824270 | .1053243 | .595246 | 1.501594 | .9347 | 1.2588 | |
| 48 | | 3 | 1.064817 | .1543710 | .0891261 | .681338 | 1.448296 | .9374 | 1.2365 | |
| 62 | | 3 | 1.458105 | .0989248 | .0571142 | 1.212362 | 1.703848 | 1.3857 | 1.5708 | |
| 72 | | 3 | 1.909257 | .0289556 | .0167175 | 1.837327 | 1.981187 | 1.8809 | 1.9388 | |
| 86 | | 3 | 1.470893 | .5465956 | .3155771 | .113075 | 2.828712 | .9242 | 2.0174 | |
| 96 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 110 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 120 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| Total | | 33 | 1.049216 | .8611344 | .1499043 | .743871 | 1.354561 | .0000 | 2.6175 | |
| Model | Fixed Effects | | | .3361609 | .0585181 | .927857 | 1.170575 | | | |
| | Random Effects | | | | .2537213 | .483890 | 1.614542 | | | .6704516 |

**ตารางที่ ข.18** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดบิวทิริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 5.297 | 10 | .530 | 58.688 | .000 |
| Within Groups | .180 | 20 | .009 | | |
| Total | 5.477 | 30 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 48 | 3 | .000000 | | | |
| 62 | 3 | .000000 | | | |
| 72 | 2 | .000000 | | | |
| 86 | 3 | .000000 | | | |
| 96 | 3 | .000000 | | | |
| 110 | 3 | .000000 | | | |
| 120 | 3 | .000000 | | | |
| 0 | 3 | | .503156 | | |
| 24 | 3 | | .613446 | | |
| 38 | 2 | | | .849461 | |
| 12 | 3 | | | | 1.210409 |
| Sig. | | 1.000 | .189 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .503156 | .1091046 | .0629916 | .232125 | .774186 | .4083 | .6224 | |
| 12 | | 3 | 1.210409 | .0341816 | .0197347 | 1.125498 | 1.295321 | 1.1772 | 1.2454 | |
| 24 | | 3 | .613446 | .2772602 | .1600762 | -.075306 | 1.302199 | .3429 | .8970 | |
| 38 | | 2 | .849461 | .0246421 | .0174246 | .628061 | 1.070861 | .8320 | .8669 | |
| 48 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 62 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 72 | | 2 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 86 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 96 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 110 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 120 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| Total | | 31 | .279999 | .4272785 | .0767415 | .123272 | .436726 | .0000 | 1.2454 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0949995 | .0170624 | .244407 | .315590 | | | |
| | Random Effects | | | | .1320310 | -.014185 | .574182 | | | .1850850 |

**ตารางที่ ข.19** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแลคติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | .181 | 10 | .018 | 44.793 | .000 |
| Within Groups | .009 | 22 | .000 | | |
| Total | .190 | 32 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 48 | 3 | .061652 | | | | | | |
| 62 | 3 | .079850 | .079850 | | | | | |
| 24 | 3 | | .100999 | .100999 | | | | |
| 0 | 3 | | | .128227 | .128227 | | | |
| 38 | 3 | | | .132940 | .132940 | | | |
| 86 | 3 | | | .136764 | .136764 | | | |
| 12 | 3 | | | | .162234 | | | |
| 110 | 3 | | | | | .211081 | | |
| 72 | 3 | | | | | .227915 | .227915 | |
| 120 | 3 | | | | | | .257367 | |
| 96 | 3 | | | | | | | .308132 |
| Sig. | | .279 | .211 | .057 | .069 | .316 | .086 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | 3 | .128227 | .0145320 | .0083900 | .092127 | .164326 | .1115 | .1372 | |
| 12 | 3 | .162234 | .0035593 | .0020550 | .153392 | .171076 | .1584 | .1654 | |
| 24 | 3 | .100999 | .0014034 | .0008102 | .097513 | .104485 | .0994 | .1019 | |
| 38 | 3 | .132940 | .0265953 | .0153548 | .066874 | .199006 | .1024 | .1506 | |
| 48 | 3 | .061652 | .0046126 | .0026631 | .050193 | .073110 | .0566 | .0657 | |
| 62 | 3 | .079850 | .0072400 | .0041800 | .061865 | .097836 | .0752 | .0882 | |
| 72 | 3 | .227915 | .0310287 | .0179144 | .150836 | .304995 | .2096 | .2637 | |
| 86 | 3 | .136764 | .0105488 | .0060904 | .110559 | .162969 | .1259 | .1470 | |
| 96 | 3 | .308132 | .0294769 | .0170185 | .234908 | .381357 | .2753 | .3324 | |
| 110 | 3 | .211081 | .0221902 | .0128115 | .155958 | .266205 | .1924 | .2356 | |
| 120 | 3 | .257367 | .0316363 | .0182652 | .178778 | .335956 | .2310 | .2924 | |
| Total | 33 | .164287 | .0770162 | .0134068 | .136979 | .191596 | .0566 | .3324 | |
| Fixed Effects | | | .0200975 | .0034985 | .157032 | .171543 | | | |
| Random Effects | | | | .0234147 | .112116 | .216459 | | | .0058961 |

**ตารางที่ ข.20** การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดแลคติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | .093 | 10 | .009 | 1.018 | .462 |
| Within Groups | .191 | 21 | .009 | | |
| Total | .284 | 31 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| 24 | 2 | .039558 | |
| 48 | 3 | .049996 | .049996 |
| 0 | 3 | .051597 | .051597 |
| 62 | 3 | .060470 | .060470 |
| 110 | 3 | .092812 | .092812 |
| 86 | 3 | .113335 | .113335 |
| 120 | 3 | .117419 | .117419 |
| 96 | 3 | .118681 | .118681 |
| 72 | 3 | .125566 | .125566 |
| 12 | 3 | .142388 | .142388 |
| 38 | 3 | | .238479 |
| Sig. | | .276 | .054 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .051597 | .0087999 | .0050806 | .029737 | .073458 | .0418 | .0588 | |
| 12 | | 3 | .142388 | .0362591 | .0209342 | .052315 | .232460 | .1181 | .1841 | |
| 24 | | 2 | .039558 | .0132344 | .0093581 | -.079348 | .158464 | .0302 | .0489 | |
| 38 | | 3 | .238479 | .2944616 | .1700075 | -.493004 | .969962 | .0663 | .5785 | |
| 48 | | 3 | .049996 | .0169016 | .0097581 | .008010 | .091982 | .0309 | .0631 | |
| 62 | | 3 | .060470 | .0080960 | .0046742 | .040359 | .080582 | .0525 | .0687 | |
| 72 | | 3 | .125566 | .0262770 | .0151711 | .060290 | .190841 | .1076 | .1557 | |
| 86 | | 3 | .113335 | .0316045 | .0182469 | .034825 | .191845 | .0774 | .1366 | |
| 96 | | 3 | .118681 | .0258078 | .0149001 | .054571 | .182791 | .0909 | .1419 | |
| 110 | | 3 | .092812 | .0684381 | .0395127 | -.077198 | .262821 | .0192 | .1545 | |
| 120 | | 3 | .117419 | .0044144 | .0025487 | .106453 | .128385 | .1124 | .1207 | |
| Total | | 32 | .106605 | .0956891 | .0169156 | .072105 | .141104 | .0192 | .5785 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0954175 | .0168676 | .071526 | .141683 | | | |
| | Random Effects | | | | .0170176 | .068687 | .144522 | | | .0000554 |

**ตารางที่ ข.21** การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแห่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกันที่ชั่วโมงที่ 120

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 21.042 | 2 | 10.521 | 1700.063 | .000 |
| Within Groups | .037 | 6 | .006 | | |
| Total | 21.079 | 8 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 |
| 0 | 3 | .000000 | |
| 120 (ชุดควบคุม) | 3 | | 3.164722 |
| 120 (ชุดทดลอง) | 3 | | 3.317102 |
| Sig. | | 1.000 | .055 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 120 (ชุดควบคุม) | | 3 | 3.164722 | .0860281 | .0496684 | 2.951017 | 3.378428 | 3.0841 | 3.2553 | |
| 120 (ชุดทดลอง) | | 3 | 3.317102 | .1056637 | .0610050 | 3.054619 | 3.579586 | 3.2247 | 3.4323 | |
| Total | | 9 | 2.160608 | 1.6232293 | .5410764 | .912884 | 3.408333 | .0000 | 3.4323 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0786674 | .0262225 | 2.096444 | 2.224772 | | | |
| | Random Effects | | | | 1.0811993 | -2.491417 | 6.812633 | | | 3.5049130 |

**ตารางที่ ข.22** การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแห่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกันที่ชั่วโมงที่ 120

**ตาราง ANOVA**

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 266.053 | 2 | 133.027 | 1992.134 | .000 |
| Within Groups | .401 | 6 | .067 | | |
| Total | 266.454 | 8 | | | |

**ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ**

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 3 | .000000 | | |
| 120 (ชุดทดลอง) | 2 | | .142666 | |
| 120 (ชุดควบคุม) | 3 | | | .163887 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 120 (ชุดควบคุม) | | 3 | 12.146417 | .0744199 | .0429663 | 11.961548 | 12.331286 | 12.0726 | 12.2215 | |
| 120 (ชุดทดลอง) | | 3 | 10.803436 | .4413496 | .2548133 | 9.707063 | 11.899809 | 10.3830 | 11.2631 | |
| Total | | 9 | 7.649951 | 5.7711992 | 1.9237331 | 3.213814 | 12.086087 | .0000 | 12.2215 | |
| Model | Fixed Effects | | | .2584104 | .0861368 | 7.439182 | 7.860720 | | | |
| | Random Effects | | | | 3.8445724 | -8.891909 | 24.191811 | | | 44.3199518 |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ตารางที่ ข.23** การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแห่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนจากยีสต์สกัดและทริปโตน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบกันที่ชั่วโมงที่ 96

ตาราง ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | .153 | 2 | .077 | 84.207 | .000 |
| Within Groups | .005 | 6 | .001 | | |
| Total | .158 | 8 | | | |

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan[a]

| ชั่วโมงที่ | N | Subset for alpha = 0.05 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 0 | 3 | .000000 | | |
| 96 (ชุดควบคุม) | 3 | | .150699 | |
| 96 (ชุดทดลอง) | 3 | | | .319228 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

| ชั่วโมงที่ | | N | ค่าเฉลี่ย | ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน | ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% | | ค่าเฉลี่ยต่ำสุด | ค่าเฉลี่ยสูงสุด | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ขอบเขตล่าง | ขอบเขตบน | | | |
| 0 | | 3 | .000000 | 0E-7 | 0E-7 | .000000 | .000000 | .0000 | .0000 | |
| 96 (ชุดควบคุม) | | 3 | .150699 | .0393795 | .0227358 | .052875 | .248523 | .1175 | .1942 | |
| 96 (ชุดทดลอง) | | 3 | .319228 | .0342782 | .0197905 | .234076 | .404379 | .2833 | .3515 | |
| Total | | 9 | .156642 | .1407434 | .0469145 | .048457 | .264827 | .0000 | .3515 | |
| Model | Fixed Effects | | | .0301427 | .0100476 | .132057 | .181228 | | | |
| | Random Effects | | | | .0922009 | -.240066 | .553351 | | | .0252002 |