การย่อยกากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

HYDROLYSIS OF SOYBEAN MEAL FOR *Clostridium* sp. CULTIVATION

สุชาดา บัวเผื่อน
สุวิชญา จันทรสาขา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HYDROLYSIS OF SOYBEAN MEAL FOR *Clostridium* sp. CULTIVATION

SUCHADA BUAPHUAN
SUWICHAYA CHANTARASAKA

SPECIAL PROJECT REPORT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การย่อยกากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. Hydrolysis of Soybean Meal for *Clostridium* sp. Cultivation
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุชาดา บัวเผื่อน รหัสประจำตัว 57050770 นางสาวสุวิชญา จันทรสาขา รหัสประจำตัว 57050776
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การย่อยกากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. Hydrolysis of Soybean Meal for *Clostridium* sp. Cultivation
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุชาดา บัวเผื่อน รหัสประจำตัว 57050770 นางสาวสุวิชญา จันทรสาขา รหัสประจำตัว 57050776
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสภาวะการย่อยกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมันถั่วเหลือง ด้วยกรดและเอนไซม์ผสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. โดยนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร T6 เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์นำสร้างผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายอินทรีย์อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากผลการศึกษา พบว่าเมื่อนำไปย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 โดยใช้อัตราส่วนต่างกันตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ที่เวลาแตกต่างกันคือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อหาสภาวะเหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายสูงสุด พบว่าที่อัตราส่วนเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 15.52 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเท่ากับ 26.21± 0.37 กรัมต่อลิตร โดยนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยใช้เป็นอาหารชุดทดลอง และเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร T6 ชุดทดลอง เปรียบเทียบกับอาหาร T6 ชุดควบคุม จากผลการเพาะเลี้ยงพบว่าในอาหารชุดทดลองที่เป็นกากถั่วเหลืองซึ่งถูกย่อย มีปริมาณอะซิโตนเท่ากับ 5.32 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 0.59 ± 0.02 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 7.78 ± 0.15 กรัมต่อลิตร จากการศึกษานี้ สามารถใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในการสร้างผลิตผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายอินทรีย์ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้

คำสำคัญ : กากถั่วเหลือง, การย่อยด้วยกรด, การย่อยด้วยเอนไซม์, กระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล , สภาวะไร้ออกซิเจน, *Clostridium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Hydrolysis of Soybean Meal for *Clostridium* sp. Cultivation
Students	Miss Suchada Buaphuan Student ID 57050770 Miss Siwichaya Chantarasaka Student ID 57050776
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

Abstract

This study investigated the hydrolysis conditions for soybean meal, a by-product of soybean oil industries, using acid and mixed enzymes, to cultivate *Clostridium* sp. Hydrolyzed soybean meal was utilized as a carbon source in the T6 medium for microbial production of organic solvents: acetone, butanol and ethanol. It has been found that after the soybean meal has been hydrolyzed with 0.1 N sulfuric acid at 121 °C for 20 minutes, subsequently, hydrolyzed with α-amylase, glucoamylase and ACCELLERASE® 1500, varying from 0 to 1.0 mL/g of soybean meal and with various period of 0, 24 and 48 h, for the optimum conditions of the maximum concentrations of reducing sugars and soluble proteins. The results showed that the maximum reduction sugar content was 15.52 ± 0.07 g/L and the soluble protein content was 26.21 ± 0.37 g/L obtained from the enzyme ratio of 1.0 mL/g soybean meal. The hydrolyzed soybean meal was then utilized as a microbial medium and as a carbon source in T6 medium, compared with control T6 medium. From the cultivation result, in hydrolyzed soybean meal the maximum solvent concentrations were 5.32 ± 0.05 g/L acetone, 0.59 ± 0.02 g/L butanol and 7.78 ± 0.15 g/L ethanol. This study showed that hydrolyzed soybean meal could be used for the production of organic solvents: acetone, butanol and ethanol.

Keyword: Soybean meal, Acid hydrolysis, Enzyme hydrolysis, Acetone-butanol-ethanol fermentation, anaerobic condition, *Clostridium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ถ่ายทอดความรู้ ให้คำปรึกษาในด้านวิชาการ ถ่ายทอดประสบการณ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในด้านการแปลเอกสาร เอื้อเฟื้อเวลา และสถานที่ในการร่วมแลกเปลี่ยนความคิดเห็นระหว่างการทำโครงงานพิเศษ ใส่ใจเป็นอย่างดีในทุกขั้นตอน ตลอดจนช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในเล่มโครงงานมาโดยตลอด จนรายงานเล่มนี้กลายเป็นเล่มโครงงานที่เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษและให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ที่คอยให้คำแนะนำ สอนเทคนิคการทำการทดลอง เป็นที่ปรึกษาในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ รวมถึงอำนวยความสะดวกในการทดลองเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ คุณพ่อคุณแม่และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ส่งเสริมสนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา ขอบคุณเพื่อนทุกคนที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำและกำลังใจที่ดี และขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยให้สามารถค้นหาเอกสารงานวิจัยต่างๆ

ขอขอบคุณ บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด พระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ ที่ให้ความอนุเคราะห์กากถั่วเหลือง

สุดท้ายนี้ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สุชาดา บัวเผื่อน
สุวิชญา จันทรสาขา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ถั่วเหลือง 3
2.2 บิวทานอล 4
2.2.1 ข้อมูลทั่วไปบิวทานอล 4
2.2.2 ประโยชน์ของบิวทานอลกับการประยุกต์ใช้ 5
2.2.3 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก 6
2.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* sp 6
2.3.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา 7
2.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation) 8
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 13
3.1 วัตถุและอุปกรณ์ 13
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ 13
3.1.2 สารเคมี 13
3.1.3 อุปกรณ์ 13
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 14
3.1.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM, MERCK) 14
3.1.2 อาหาร T6 14
3.3 กากถั่วเหลือง 15
3.4 การย่อยกากถั่วเหลือง 15
3.3.1 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก 15
3.3.2 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ผสม 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. 16
3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ 16
3.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ 16
3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง 16
3.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง (proximate analysis) 16
3.6.1.1 ปริมาณความชื้น 16
3.6.1.2 ปริมาณโปรตีน 17
3.6.1.3 ปริมาณไขมัน 17
3.6.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ 18
3.6.1.5 ปริมาณเถ้า 19
3.6.2 การวิเคราะห์ทางเคมี 19
3.6.2.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) 19
3.6.2.2 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธีลอว์รี-ฟอลิน (Lowry - Folin method) 19
3.6.2.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง 20
3.6.2.4 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังโดยใช้เครื่อง HPLC 20
3.6.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และสารอินทรีย์อื่น ๆ โดยใช้เครื่อง HPLC 20
3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 22
4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบถั่วเหลือง 22
4.2 การย่อยการถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ผสมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม 28
4.3 ชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ 29
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp 33
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 46
5.1 สรุปผลการวิจัย 46
5.2 ข้อเสนอแนะ 48
เอกสารอ้างอิง 49
ภาคผนวก 51
ภาคผนวก ก 52
ภาคผนวก ข 74
ภาคผนวก ค 107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล 5

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบถั่วเหลือง 22

4.2 ผลของอัตราส่วน ACCELLERASE® 1500 ต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นโปรตีนละลายน้ำที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 25

4.3 ผลของเวลาต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเอนไซม์ ACCELLERASE®1500 27

4.4 ชนิดของน้ำตาลจากส่วนใสที่ได้จากการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ 29

4.5 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 30

4.6 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 33

4.7 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 36

4.8 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริกที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 39

4.9 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริกที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 40

4.10 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริกที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง 41

4.11 เปรียบเทียบการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 กากถั่วเหลือง 4

2.2 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอลโครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล 5

2.3 รูปร่าง และลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ *C.beijerinckii* 7

2.4 วิถีทำงานชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp

(ก) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนา เกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase)

(ข) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศร ชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) 9

4.1 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 25

4.2 เปรียบเทียบการย่อยกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่เวลาที่แตกต่างกัน

(ก) เปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

(ข) เปรียบเทียบความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ 27

4.3 การวิเคราะห์อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม

(ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้

(ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เชื้อ *Clostridium* G10

(ค) น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 31

4.4 การวิเคราะห์อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ T6 ชุทดลอง เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

(ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้

(ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10

(ค) น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 34

4.5 การวิเคราะห์อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมได้จากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

(ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำได้

(ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10

(ค) น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 36

4.6 การวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง

(ก) อาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

(ข) อาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

(ค) อาหารชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

บิวทานอลเป็นสารเคมีที่สำคัญในด้านอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมโพลีเมอร์และพลาสติก ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้รับความสนใจในด้านพลังงานทางเลือกเชื้อเพลิงทดแทนเป็นพิเศษ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ คือ ให้พลังงานสูง มีความดันไอต่ำ มีความสามารถในการกัดกร่อนน้อย และมีความสามารถในการผสมกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลในสัดส่วนที่สูง จุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่เหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรงและไม่ส่งผลต่อเครื่องยนต์ รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย ในขณะที่เอทานอลต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Huber และคณะ, 2006)

กระบวนการทางชีวภาพในการผลิตบิวทานอล นิยมนำเชื้อแบคทีเรียจีนัส *Clostridium* มาใช้ในกระบวนการหมัก เนื่องจาก *Clostridium* sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติน้ำ ดิน บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงด้วยนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยกระบวนการการหมัก เช่น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอล และอะซิโตน แต่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตน และเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก (สุนทร, 2555)

ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง จากกระบวนการจะมีกากถั่วเหลืองที่เหลือจากการสกัดน้ำมันซึ่งมีโปรตีนเหลืออยู่มาก (นีรนุช และเพชรรัตน์, 2545) ข้อมูลจากบริษัทธนากรผลิต น้ำมันพืช ระบุว่าจากการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองพบว่า ในกากถั่วเหลืองมีปริมาณไขมันถึง 1.27% ปริมาณโปรตีน 46.12% ไฟเบอร์ 6.49% และเถ้า 6.80%

ดังนั้นการนำกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่า โครงงานพิเศษนี้จึงสนใจการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลืองเพื่อนำไปสู่การย่อยให้เหมาะสม และใช้สภาวะการย่อยที่ดีที่สุดในการเตรียมกากถั่วเหลืองเพื่อนำมาเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp.

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลืองเพื่อนำไปสู่สภาวะการย่อยที่เหมาะสม
2. เพื่อใช้สภาวะการย่อยที่ดีที่สุดในการเตรียมกากถั่วเหลือง เพื่อนำมาเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp.
3. เพื่อเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. ให้ผลิตอะซิโตน-บิวทานอลและเอทานอล โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น กากถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การย่อยกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 โดยทำการย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.66 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 90 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อหาสภาวะในการย่อยที่ดีที่สุด โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีนที่ละลายน้ำได้ จากนั้นนำไปใช้ในการหมักเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการสภาวะไร้ออกซิเจน และทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่า
2. ทราบสภาวะการย่อยที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการหมักเชื้อ *Clostridium* G10
3. ทราบถึงความเป็นไปในการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล และเอทานอลจากการใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยง *Clostridium* G10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L) Merrill) อยู่ในวงศ์ *Leguminosae* วงศ์ย่อย *Papilionoideae* ถั่วเหลืองเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก และของประเทศไทยเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยปริมาณโปรตีน 30 - 50 % ปริมาณน้ำมัน 13 - 24 % และปริมาณคาร์โบไฮเดรท 12 - 24% ดังนั้นถั่วเหลืองจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย อาทิเช่น ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ทั้งในรูปของการบริโภคโดยตรงหรือแปรรูปเป็นอาหารต่าง ๆ หรือใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันและอุตสาหกรรมอื่น ๆ ส่วนกากถั่วเหลืองยังใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด แต่มีกรดอะมิโนเมไธโอนีน และซิสทีอีนในระดับที่ต่ำ ซึ่งเมื่อใช้กากถั่วเหลืองในการเลี้ยงสัตว์จะทำให้สัตว์ได้ประโยชน์จากโปรตีนไม่เต็มที่มีการเจริญช้าหรือระงับการเจริญเติบโต เพราะกากถั่วเหลืองมีสารการยับยั้งการใช้ประโยชน์จากโปรตีน (trypsin inhibitors) ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (สุภาพรรณ และคณะ, 2554)

ถั่วเหลืองมีแหล่งกำเนิดในเขตอบอุ่น แต่ปัจจุบันมีการปลูกถั่วเหลืองกันแพร่หลาย ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เนื่องจากการปลูกถั่วเหลืองช่วยบำรุงดินเพราะมีไรโซเบียมอาศัยอยู่ในปมที่รากถั่วเหลืองทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ สำหรับประเทศไทยนั้นมีการปลูกถั่วเหลืองกันมานานแล้ว เริ่มปลูกกันในภาคเหนือต่อมาขยายไปยังภาคอื่น ๆ ยกเว้นภาคใต้ปัจจุบันมีพื้นที่การปลูกถั่วเหลืองทั้งในฤดูฝน และฤดูแล้งรวมกันประมาณ 1.46 ล้านไร่ ได้ผลผลิตถั่วเหลืองประมาณ 3.2 แสนตัน แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ในประเทศจึงมีการนำเข้าประมาณปีละ 1.5 ล้านตัน (กรมวิชาการการเกษตร, 2547) ทั้งในรูปของเมล็ดและกากถั่วเหลือง จึงจัดได้ว่าถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยพืชหนึ่ง ซึ่งนอกจากจะเป็นพืชอาหารของมนุษย์ และสัตว์โดยตรงแล้วยังมีส่วนสำคัญในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกมากมาย เช่น ไก่สดแช่แข็ง ทำสีสบู่ เครื่องสำอาง หมึกพิมพ์ ตลอดจนยารักษาโรคอื่น ๆ

ถั่วเหลืองเป็นธัญพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากอุดมไปด้วยโปรตีน และสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อประกอบอาหารได้หลากหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องผ่านการหมักดอง เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำเต้าหู้ เต้าหู้ เต้าฮวย และผลิตภัณฑ์ที่ต้องผ่านการหมักดอง เช่น อาหารพื้นบ้านในภาคเหนือและชาวไทยภูเขาที่เรียกกันว่าถั่วเน่าหรือถั่วเหลืองหมัก รวมทั้งซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถรับประทานในรูปแบบของถั่วเหลืองฝักสด หรือถั่วแระญี่ปุ่น ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยมีการปรับปรุงพันธุ์ และส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูกเพิ่มขึ้น ได้ผลผลิตที่มีลักษณะของเมล็ดขนาดโต และมีรสชาติหวานมันอร่อย นอกจากจะเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญแล้วในถั่วเหลืองยังพบสารกลุ่มไอโซฟลาโวน (Isoflavones) เช่น เจนีสทีน (genistein) เดดซีน (daidzein) และไกลซิทีน (glycitein) ซึ่งจัดเป็นสารจากพืชที่มีฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) ฮอร์โมนที่มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศหญิง สำหรับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์มีข้อมูลระบุว่าการบริโภคถั่วเหลืองมีผลช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ (hot flashes) ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่มีระดับฮอร์โมนลดลงตามวัย ลดระดับไขมันในเลือด

เอกสารนี้เป็นสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ว่าการนำไปใช้ในการค้า

และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีผลช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ มีผลต่อการเรียนรู้และจดจำช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (นพพร, 2542)

กากถั่วเหลือง (soybean meal) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมัน ในปัจจุบันมีกากถั่วเหลืองเหลือทิ้งจากกระบวนการการสกัดน้ำมันออกเป็นจำนวนมาก ซึ่งกากถั่วเหลืองถือว่าเป็นอาหารโปรตีนจากพืชที่ดีที่สุด ได้จากการนำถั่วเหลืองไปสกัดน้ำมันออกมีหลายวิธี เช่น วิธีอัดแน่น (hydraulic process) วิธีอัดเกลียว (screw process) และวิธีสกัดด้วยสารเคมี (solvent process) ซึ่งจะมีคุณภาพแตกต่างกัน โดยเมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ย 43 – 50% ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดและขนาดของเมล็ด ในทางการค้าได้แบ่งออกเป็น 2 เกรด คือ กากถั่วเหลือง 44 % และ 48% โดยกากถั่วเหลือง 44 % เป็นกากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ด้วย ส่วนกากถั่วเหลือง 48% คือกากถั่วเหลืองที่กระเทาะเอาเปลือกออก ไม่มีส่วนของเปลือกปนอยู่ ดังรูป 2.1 ในถั่วเหลืองดิบมีสารพิษจำพวกตัวยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ซึ่งจะขัดขวางการย่อยโปรตีนของน้ำย่อยทริปซิน และยังมีสารเฮเมกลูทินิน (hemagglutinin) ซาโพนิน (saponin) และไอโซฟลาโวน (isoflavone) (สุภาพรรณ และคณะ, 2554)

รูปที่ 2.1 กากถั่วเหลือง
ที่มา : http://www.thaitechno.net/dip/productdetails.php?id=116724&uid=44163 (6 พ.ค. 61)

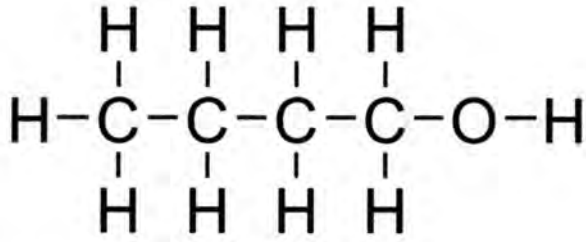
2.2 บิวทานอล (Butanol)

2.2.1 ข้อมูลทั่วไปของบิวทานอล

บิวทานอลมีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน ได้แก่ ชื่อทางเคมี บิวทิลแอลกฮอล์ (butyl alcohol) 1-บิวทานอล (1- Butanol) ชื่อทางการค้า ได้แก่ เอ็น.บี.เอ (NBA) เอ็น-บิวทานอล (n-Butanol) หรือชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ บิวทาน-1-ออล (Butan-1-ol) เอ็น-บิวทิลแอลฮอกล์ (N-Butyl alcohol) และชื่อทางการผลิตทางชีวภาพ ได้แก่ ไบโอบิวทานอล (Biobutanol) (สุนทร, 2555)

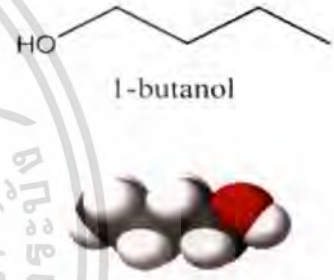
บิวทานอล มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนเป็นอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุล คือ C_4H_9OH มีน้ำหนักโมเลกุล 74.12 มีจุดเดือดที่ 117-118 องศาเซลเซียส มีจุดหลอมเหลว -89.3 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติเป็นของเหลวไม่มีสี มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายเอทานอล มีไอระเหยที่ทำให้ระคายเคือง ดังตารางที่ 2.1 และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล
ที่มา : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Butanol_flat_structure.png (16 ธ.ค. 60)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

คุณสมบัติ	Butanol	Chemical structure
จุดหลอมเหลว (°C)	-89.3	
จุดเดือด (°C)	117-118	
ความถ่วงจำเพาะ	0.810-0.812	
อุณหภูมิที่ติดไฟได้ (°C)	35-37	
ความดันไอ (kPa at 20°C)	0.58	
จุดวาบไฟ (°C)	25-29	
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4	

ที่มา : ดัดแปลงจาก สุนทร (2555)

2.2.2 ประโยชน์ของบิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

ชนิกา และคณะ (2555) จากการศึกษาการผลิตไบโอบิวทานอลที่ใช้เป็นพลังงานทดแทน พบว่าจากปัญหาสิ่งแวดล้อมและวิกฤตพลังงาน พลังงานทางเลือกทดแทนจึงเป็นทางออกที่น่าสนใจ เชื้อเพลิงทางเลือกเหลวซึ่งเป็นที่นิยมในขณะนี้ ได้แก่ ไบโอเอทานอลและไบโอบิวทานอล ไบโอบิวทานอลจัดเป็นเชื้อเพลิงหมุนเวียนที่ดี เนื่องจากให้พลังงานสูง และสามารถผสมกับก๊าซโซลีนได้มากกว่าไบโอเอทานอลโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ โดยการผลิตไบโอบิวทานอลนั้นได้จากกระบวนการหมัก ABE โดยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* sp.

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย (Lee และคณะ, 2008) บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิล อะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสีนอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำละลายสำหรับสารเคลือบไม้ และวัสดุต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid Curable Lacquers และ Baking Finish) การใช้ประโยชน์จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอล และสารประกอบอื่น ๆ คือ เป็นทินเนอร์สำหรับผสมสี (Paint Thinner) เป็นตัวทำละลายในสี (Solvent for Dyes) เช่น หมึกพริ้นท์ และเป็นสารสกัดในกระบวนการผลิตยา ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย และสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ฮอร์โมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด เป็นต้น (ชนิกาและคณะ, 2555)

2.2.3 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (acetone – butanol – ethanol, ABE fermentation) ทั้งนี้ ABE เป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3 : 6 : 1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย ในกลุ่ม Clostridia ในกระบวนการหมัก ทั้งนี้ *Clostridium* sp. จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สามารถสร้างสปอร์และเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยสภาพธรรมชาติแล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้มีวิถีในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้ถูกจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก โดยแบคทีเรีย *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylicum* และ *C. beijerinckii* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำไปใช้ในกระบวนการผลิตบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Jones และ Woods, 1986) ซึ่งบิวทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล (Molasses), สารชีวมวลทางการเกษตร (Agricultural biomass) และวัตถุดิบประเภทที่ให้แป้ง (Starchy material) จำพวกข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวไรย์ และมันสำปะหลัง และของเสียจากอุตสาหกรรมนม (Dairy industry waste) เป็นต้น (สุนทร, 2555)

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* sp.

Clostridium sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในธรรมชาติน้ำ ดิน บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงด้วยนม และมีเพียง 2-3 สปีชีส์ ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้ สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและอะซิโตน แต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตน และเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก (สุนทร, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

รูปร่างและลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ *Clostridium* ดังรูปที่ 2.3

รูปที่ 2.3 รูปร่าง และลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ *Clostridium beijerinckii*
ที่มา : https://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html (20 ธ.ค. 60)

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Clostridium* มีดังนี้

Kingdom: Bacteria

Division: Firmicutes

Class: Clostridia

Order: Clostridiale

Family: Clostridiaceae

Genus: *Clostridium*

เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8mm และกว้าง 0.4-1.2 mm (ชนิกาและคณะ, 2555) ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงจะมีการเรียงตัวกันของเซลล์เป็นสายสั้น ๆ มีปลายแหลมและปลายกลม มีสปอร์อยู่ภายในเซลล์ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี เป็นพวก obligate anaerobes หรือมีบางชนิดเท่านั้นเป็น aerotolerant ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ สปอร์จะไม่งอก ถ้าขาดสภาวะที่เหมาะสม สปอร์ทนความร้อนได้ดี สามารถทนอุณหภูมิถึง 120 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 10-15 นาที แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญคือ 10-65 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงใน blood agar และ egg yolk agar ในสภาพไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจาก blood agar สามารถนำมาตรวจดูปฏิกริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ตรวจลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญใน egg yolk agar สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ lecithinase โดยดูจากลักษณะการตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ lipase โดยดูจากความเป็นเงา (lridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

ลักษณะสำคัญของ *Clostridium* แต่ละสปีชีส์ คือ ความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างชนิดกันได้ นอกจากนี้ *Clostridium* บางชนิดยังสามารถให้ก๊าซมากพอที่จะนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

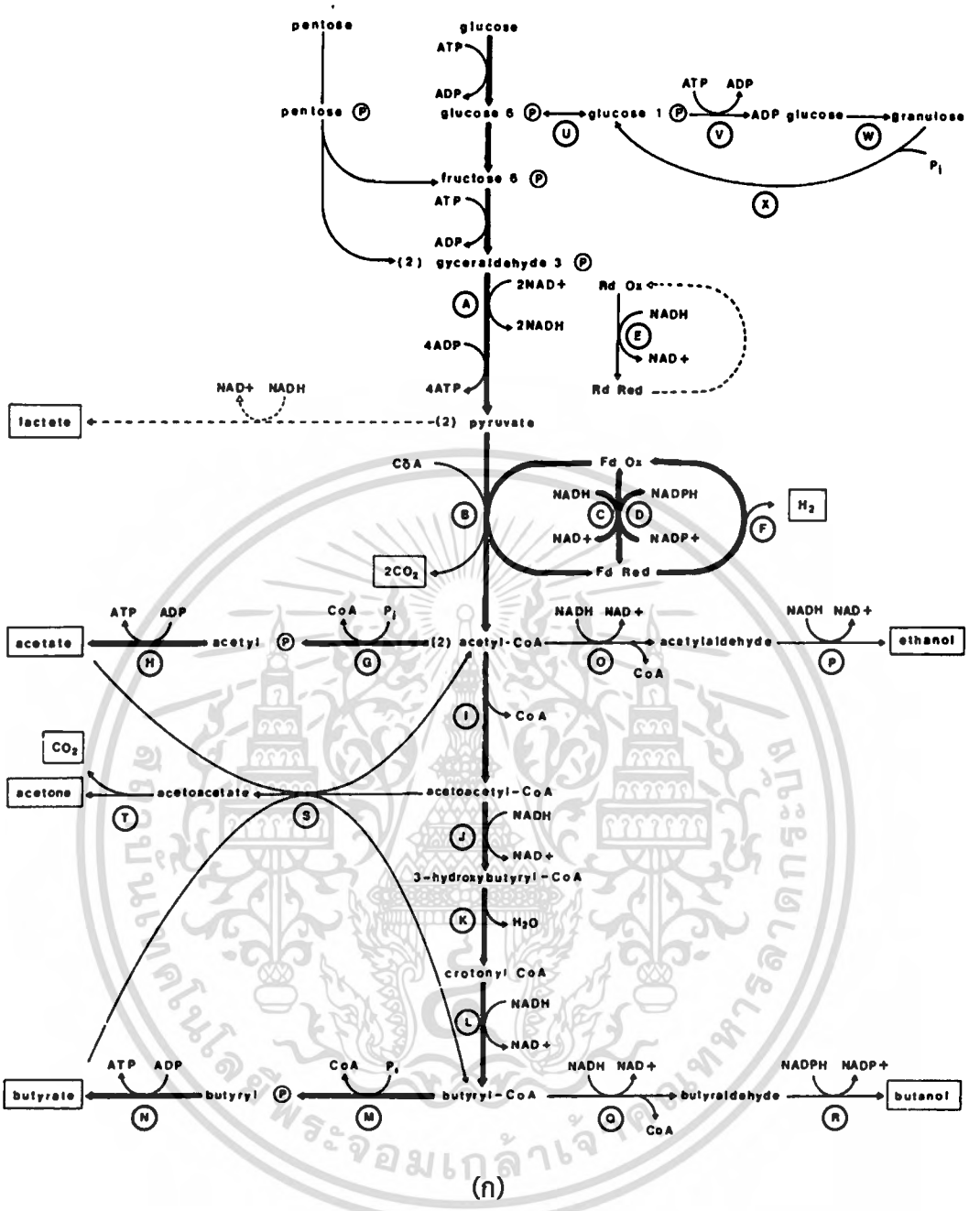
Clostridium มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล การคัดเลือกและคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการผลิตบิวทานอลจึงเป็นที่สนใจเพิ่มขึ้น โดย *Clostridium* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการหมักเนื่องจากช่วยลดต้นทุนในการใช้ใบพัดในกระบวนการหมักด้วยถังหมัก (Jones และ Woods, 1986)

2.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

สุนทร และคณะ (2555) จากการศึกษารูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ในวิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน ทั้งนี้น้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic) โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ NADH กับ H+ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ดังรูปที่ 2.4

ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) จะถูก metabolize ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้างสารFructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvateferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วย ซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตน และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ (Jone และ Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH กับ H+ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD+ ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

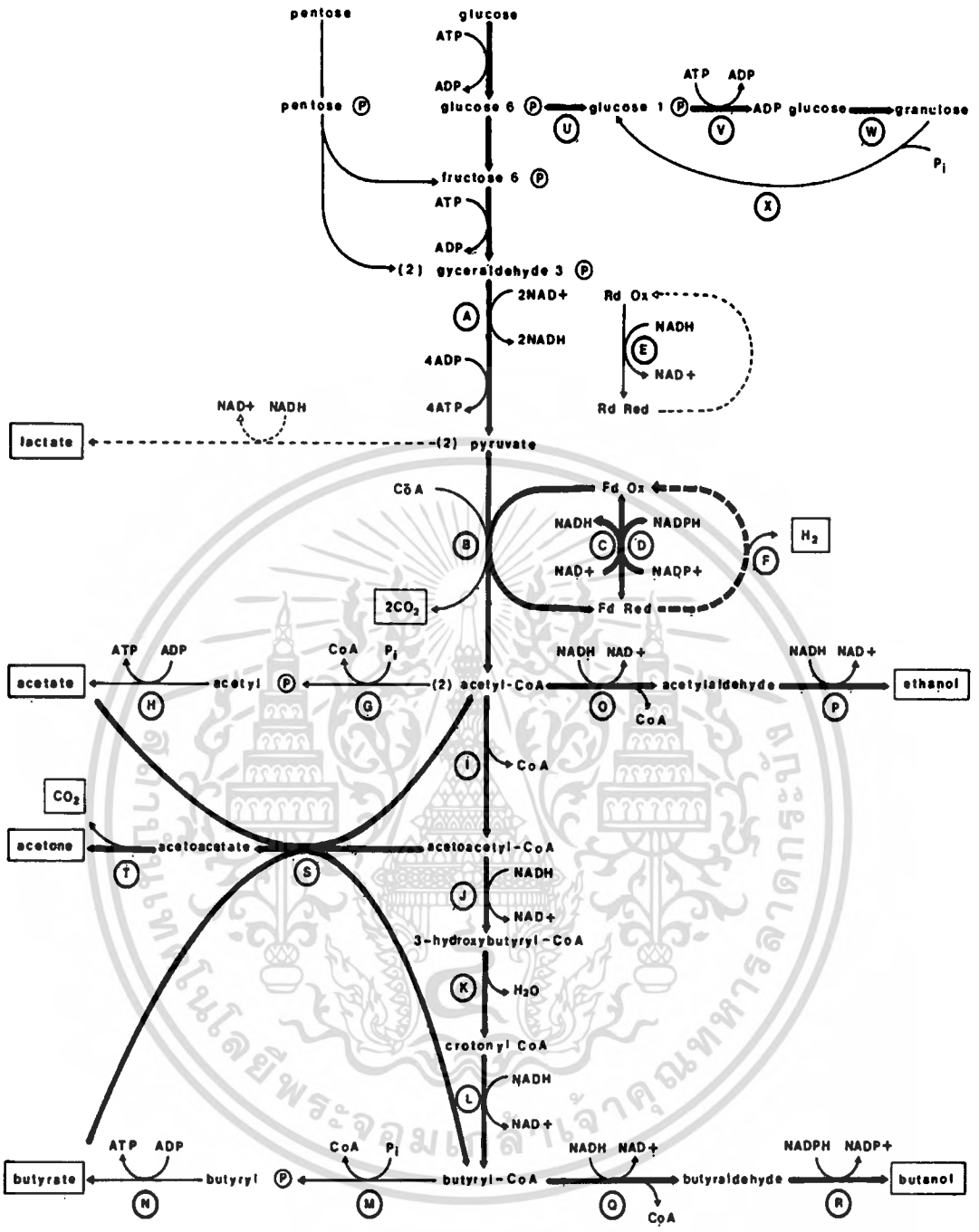


รูปที่ 2.4 วิถีการทำงานชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp.

(ก) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase)

(ข) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศร ชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 2.4 (ต่อ) วิถีการทำงานชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp.

(ก) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase)

(ค) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศร ชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

ที่มา : Jones และ Woods, 1986

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษรในวงเล็บหน้าชื่อ

(A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;

(B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ;

(C) NADH-ferredoxin oxidoreductase ;

(D) NADPHferredoxin oxidoreductase;

(E) NADH rubredoxin oxidoreductase;

(F) hydrogenase;

(G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase);

(H) acetate kinase;

(i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase);

(J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase;

(K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase;

(M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase);

(N) butyrate kinase;

(O) acetaldehyde dehydrogenase;

(P) ethanol dehydrogenase;

(Q) butyraldehyde dehydrogenase;

(R) butanol dehydrogenase;

(S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase;

(T) acetoacetate decarboxylase;

(U) phosphoglucomutase;

(V) ADP-glucose pyrophosphorylase;

(W) granulose (glycogen) synthase;

(X) granulose phosphorylase;

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Buakhiaw (2017) ได้ทำการวิเคราะห์ผลของสูตรอาหารโดยใช้เชื้อ *Clostridium* sp. ต่อการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยในการทดลองใช้เชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ G10 ที่แยกได้จากตะกอนบึงในสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง มาทดสอบความสามารถในการผลิตไบโอบิวทานอลได้ 5.89 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้น ABE ทั้งหมด 8.48 กรัมต่อลิตร องค์ประกอบของอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต ABE ของ *Clostridium* สายพันธุ์ G10 อย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Clostridium* สายพันธุ์ G10 ในสูตรอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ RCM, T6, GYCC และ P2 ซึ่งในอาหาร แต่ละชนิดจะมีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร T6 ให้ปริมาณไบโอบิวทานอลสูงที่สุด คือ 13.49 กรัมต่อลิตร และปริมาณตัวทำละลายรวม เท่ากับ 16.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณอะซิโตน 2.63 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเลือกสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมมีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* spp. เพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mechmecha และคณะ (2015) ได้นำน้ำ alfalfa มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของ *Clostridium acetobutylicum* สำหรับใช้ในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เป็นการเปลี่ยนกากของเสียทางอุตสาหกรรมการเกษตรให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ ทางการตลาดมีความสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาอย่างยั่งยืน วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการใช้น้ำ alfalfa เพื่อทดแทนหรือเสริมในอาหารที่ใช้ในการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ที่มีราคาแพง โดยการทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด ตามช่วงเวลาที่ทำการเก็บเกี่ยวดอก alfalfa ที่แตกต่างกันคือ เดือนมิถุนายน กรกฎาคม และสิงหาคม เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของแต่ละช่วงเวลา ซึ่งเดือนกรกฎาคมเป็นเดือนที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวดีที่สุด เนื่องจากมีอัตราส่วนของ C : N และองค์ประกอบของสารอาหารในน้ำสกัดเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบ และสารอาหารในน้ำที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างถูกนำไปใช้ในการหมัก เพื่อศึกษาผลของการเสริมไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium* และการผลิตบิวทานอล ในการทดลองแรกใช้อาหารสังเคราะห์มาตรฐานที่มีไซโลส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและมียีสต์กัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน น้ำ alfalfa ถูกนำมาใช้แทนที่หรือใช้เสริมในสัดส่วนที่ต่างกันในสัดส่วนร้อยละ 10, 25 และ 50 โดยปริมาตร เมื่อใช้น้ำ alfalfa แทนยีสต์สกัดมีความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.9 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของบิวทานอลเท่ากับ 3.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์โดยทั่วไป การเสริมอาหารด้วยน้ำ alfalfa ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เพิ่มความเข้มข้นของการผลิตบิวทานอลถึง 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสัดส่วน C : N ที่เพิ่มขึ้นในการผลิตบิวทานอลอยู่ระหว่าง 21 ถึง 35 ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้น้ำ alfalfa เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลโดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน

Al-Shorgani และคณะ (2012) นำรำข้าว (Rice bran, RB) และน้ำมันรำข้าว (de-oiled rice bran, DRB) มาปรับสภาพและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 การทดลองใช้กรดซัลฟิวริก และ XAD-4 เรซิ่น ในการปรับสภาพ ซึ่งการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมที่สุด โดยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก เมื่อนำไปเลี้ยงเชื้อให้ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลรวมสูงสุด คือ 12.13 กรัมต่อลิตร ปริมาณไบโอบิวทานอลเท่ากับ 7.72 กรัมต่อลิตร ซึ่ง DRB ที่ได้รับการปรับสภาพและนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยง ให้ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล มากกว่า RB ที่ปรับสภาพ แต่เมื่อทำการปรับสภาพด้วย XAD-4 เรซิ่น ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ให้ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกจึงเป็นวิธีการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับ RB และ DRB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

ศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ (บุษบา, 2560) โดยการถ่ายเชื้อและเก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน

3.1.2 สารเคมี

3,5- dinitrosalicylic acid (DNS)	กรดซิตริก (Citric acid)
กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (Boric acid)	กรดบิวทิริก (Butyric acid)
กรดอะซิติก (Acetic acid)	กรดแลคติก (Lactic acid)
กลีเซอรอล (Glycerol)	กลูโคส (Glucose)
กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)	กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)
อะซีเตตบัฟเฟอร์ (Acetate buffer)	เซลโลไบโอส (Cellobiose)
คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate)	บิวทานอล (Butanol)
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	ไซโลส (Xylose)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	เมทานอล (Methanol)
ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)	มอลโตส (Maltose)
วุ้น (Agar)	ยีสต์สกัด (Yeast extract)
เอทานอล (Ethanol)	อะซิโตน (Acetone)
สารละลายโฟลิน (Folin – Ciocalteu)	
ซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริกโมโนไฮเดรต (Cysteine – HCl $\cdot H_2O$)	

3.1.3 อุปกรณ์

หม้อนึ่งความอัดไอ (Autoclave)	บีกเกอร์
กระบอกตวง	ช้อนตักสาร
ขวดรูปชมพู่	คีมคีบ (forceps)
ถ้วยอะลูมิเนียม	ลูปเขี่ยเชื้อ
ออโต้ปิเปตต์	กระดาษกรอง
ลูกยางดูดสาร	ลูปเขี่ยเชื้อ
แท่งแก้วคนสาร	ขวดปรับปริมาตร
ตู้อบลมร้อน	ตะแกรงร่อน
ขวดลดความดัน (Suction flask)	อ่างควบคุมอุณหภูมิ
ปั๊มดูดอากาศ	กรวยกรองบุชเนอร์
เครื่องชั่งสาร	ปิเปตแก้ว
กระดาษวัดพีเอช	น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์ (ต่อ)

จุกสาลี	หลอดปั่นเหวี่ยง
หลอดทดลอง	ตู้เย็น
ฟรอยด์	ถาดเหล็ก
เทอร์โมมิเตอร์	ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
เครื่องโซนิเคเตอร์	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
เครื่องปั่นเหวี่ยง	เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	แผ่นดูดความชื้น
Anaerobic Jar	คิวเวตต์ (Cuvette)
พาราฟินออยล์	

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM, MERCK)

ในส่วนผสมของอาหาร 30.00 กรัม มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่ออาหาร 1 ลิตร ดังนี้

เปปโตน (Peptone)	10.00	กรัมต่อลิตร
อาหารสกัด (Beef extract)	10.00	กรัมต่อลิตร
เดกซ์โทรส (Dextrose)	5.00	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตท (CH_3COONa)	5.00	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3.00	กรัมต่อลิตร
แป้งละลายน้ำ (Soluble starch)	1.00	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.05	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	1.00	กรัมต่อลิตร

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 อาหาร T6

ดัดแปลงจากอาหาร TYA ของ Ogata และคณะ (1973) มีส่วนประกอบดังนี้

กลูโคส (Glucose)	50.00	กรัมต่อลิตร
ทริปโตน (Tryptone)	6.00	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอะซิเตต	3.00	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.00	กรัมต่อลิตร
Dipotassium hydrogen phosphate	0.50	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.50	กรัมต่อลิตร
Magnesium Sulphate Tetrahydrate	0.30	กรัมต่อลิตร
Ferrous sulfate Pentahydrate	0.01	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

โดยอาหารที่ใช้ในการทดลองจะแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ อาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อย มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อย มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร โดยอาหารชุดควบคุมและชุดทดลองจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 กากถั่วเหลือง

ได้รับความอนุเคราะห์กากถั่วเหลืองจาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ถนนพระสมุทรเจดีย์ ตำบลปากคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ในช่วงเดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2560 นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการบด โดยไม่แยกขนาดไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง และนำไปศึกษาการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรด และการย่อยด้วยเอนไซม์ผสม

3.4 การย่อยกากถั่วเหลือง

3.4.1 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก

นำตัวอย่างกากถั่วเหลืองมาใส่ลงขวดแก้วย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที (ชลธิชา และคณะ, 2559) แล้วนำส่วนใสกับตะกอนที่เหลือทำการปรับพีเอชเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วจึงไปทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500

3.4.2 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ผสม

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5 นำมาเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.66 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน คือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาบ่มนำตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำส่วนใสกับตะกอนมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และนำส่วนใสที่ไม่มีตะกอนไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5 Dintrosalicyic acid) และวิเคราะห์หาโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีลอว์รี - ฟอลีน (Lowry - Folin method) ที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีนที่ละลายสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* G10 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อโดยทำการถ่ายเชื้อ *Clostridium* G10 ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ เก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง Reinforced Clostridium บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร T6 ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตรในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

3.5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ทำการถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.5.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับอาหาร T6 ชุดทดลอง และอาหารชุดทดลองที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรด และเอนไซม์ที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในหัวข้อ 3.3 โดยจะเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อปรับให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 โดยทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 และ 24 ชั่วโมง ใส่หลอดเซนตริฟิวเพื่อนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างต่อไป โดยหลังการเก็บตัวอย่างจะเติมอาหาร T6 ที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลจากกากถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เติมลงในอาหาร T6 ชุดควบคุม อาหาร T6 ชุดทดลอง และอาหารชุดทดลองที่มีน้ำตาลจากการย่อยกากถั่วเหลือง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน ทั้ง 3 ซ้ำ เพื่อปรับให้ปริมาตรอาหารเท่าเดิม

3.6 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง (proximate analysis)

3.6.1.1 ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำถ้วยอบความชื้นใส่ในตู้อบความร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปชั่ง และบันทึกน้ำหนักถ้วยอบ (W_1) หลังจากนั้นชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลือง 1 กรัม (W) ลงในถ้วยอบ ใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักคงที่ ขณะอบเปิดฝาถ้วยออก เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำไปใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักพร้อมกับบันทึกน้ำหนักถ้วยอบ และตัวอย่างหลังอบ (W_2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้นร้อยละ} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100$$

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
W_1 คือ น้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)
W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

3.6.1.2 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

การย่อยตัวอย่าง

ใช้เครื่องย่อยสารแบบอัตโนมัติ ชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลือง 1 กรัม นำตัวอย่างใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) เติมคะตะลิสต์ 1 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส ทำการย่อยในตู้ดูดควันจนได้สารละลายใสมีสีเขียวอ่อนหรือฟ้า

การกลั่น

เปิดเครื่องหล่อเย็น จากนั้นเปิดเครื่องกลั่นโปรตีน ตั้งระบบการทำงานของเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยน้ำกลั่น เติมกรดบอริกร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 1-2 หยด นำขวดรูปชมพู่วางเข้าเครื่อง ทำการกลั่นเป็นเวลา 4 นาที

การไตเตรต

นำสารละลายในขวดรูปชมพู่มาไตเตรตกับสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติซึ่งเป็นสารละลายสีชมพู่อ่อน โดยเทียบกับน้ำกลั่นที่เป็นตัวควบคุม (blank)

คำนวณผลการวิเคราะห์โปรตีนดังนี้

$$\%\ \text{ไนโตรเจน} = \frac{(\text{ปริมาตร } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ไตเตรท} - \text{ปริมาตรของ } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ไตเตรท blank}) \times 0.1 \times 0.014}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

% โปรตีน = % ไนโตรเจน x 6.25 (conversion factor)

3.6.1.3 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก (W_2) ชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลืองมา 2 กรัม (W_1) ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิ้ล เปิดเครื่องสกัดและเครื่องทำความเย็น นำทิมเบิ้ลที่มีตัวอย่างวางลงในที่ใส่ทิมเบิ้ล เติมสารละลายปิโตเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมเพื่อสกัดไขมัน เปิดเครื่องทำความร้อนทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยการสกัดต้องหมั่นตรวจดูสารละลายไม่ให้แห้งจนไหม้ติดกันขวด เมื่อครบเวลาทำการระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้เหลือแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไขมันแล้วนำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำออกมาใส่โถดูดความชื้นรอจนเย็นจากนั้น แล้วไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) แล้วจึงนำไปคำนวณตามสูตร

สูตรคำนวณ % ไขมัน

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

W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
W_2 คือ น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)
W_3 คือ น้ำหนักขวดก้นกลม + น้ำหนักไขมัน (กรัม)

3.6.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

ทำการส่งกากถั่วเหลืองตรวจวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยหยาบที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยมีรายละเอียดดังนี้

นำครูซิเบิ้ลกระเบื้อง (crucible) ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำตัวอย่างกากถั่วเหลือง 1 กรัม (W_1) ที่ผ่านการวิเคราะห์ความชื้น และสกัดไขมันแล้วใส่ลงไปในครูซิเบิ้ลที่ชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก วางครูซิเบิ้ลแก้วลงบนตัวเครื่องสกัดเส้นใย เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนแล้วเทลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายออก ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อน ประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายด่างออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วย อะซิโตนอีกทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 225 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_2) จากนั้นนำกากที่ได้ไปอบต่ออุณหภูมิ 500 - 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วจึงนำมาชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_3) แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

สูตรการคำนวณ % เยื่อใยหยาบ

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

W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
W_2 คือ น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการอบ (กรัม)
W_3 คือ น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.5 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่าง 5 กรัม ที่ทำการวิเคราะห์เยื่อใยหยาบแล้ว นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รออุณหภูมิลดจนเหลือต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้ถ้วยสัมผัสกับอากาศเย็นกะทันหัน ซึ่งอาจเป็นผลทำให้ถ้วยแตก นำครูซิเบิ้ลออกใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นแล้วจึงนำไปชั่งบันทึกน้ำหนักแล้วคำนวณตามสูตร

สูตรการคำนวณ % เถ้า

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

3.6.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

การเก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิว แบ่งเป็นส่วนใสและส่วนที่เป็นตะกอน โดยแบ่งส่วนใส 2 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริกด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถะสูง (Hight Performance Liquid Chromatography, HPLC) ส่วนใสที่เหลือ 8 มิลลิลิตร นำไปวัดความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3,5 Dinitrosalicylic acid) รวมถึงวิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธีลอว์รี – ฟอลีน (Lowry – Folin method) ส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงข้างต้นนำไปเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำไป Vortex จากนั้นแบ่งตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนที่เป็นส่วนใส เทส่วนใสทิ้ง นำส่วนตะกอนที่ได้มาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างตะกอนก่อนนำไป vortex และนำไปวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 nm จากนั้นนำตัวอย่างอีก 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนไปอบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

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

ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละการเจือจางมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วทำการคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างวัดได้จากกราฟมาตรฐานของ Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ก)

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

ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยให้ใส่อย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็วและผสมให้เข้ากันภายในสองนาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วทำการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของตัวอย่างที่วัดได้จากกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ก)

3.6.2.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดพร้อมบันทึก และนำตัวอย่างมาปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(\text{น้ำหนักหลอด}+\text{น้ำหนักเซลล์หลังอบ})-(\text{น้ำหนักหลอดก่อนอบ})}{3} \times 100$$

3.6.2.4 การวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลหลังโดยใช้เครื่อง HPLC

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรดและเอนไซม์ผสมก่อนการปรับสภาพ มาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลกลูโคส มอนโตส ไซโลสและเซลโลไบโอส ด้วยเครื่อง HPLC โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจาง 10 เท่า โดยใช้กลีเซอรอลร้อยละ 5 เพื่อเป็น Internal standard 9 ส่วนต่อตัวอย่าง 1 ส่วน โดยปริมาตร แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5mM เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) อัตราการไหล 1 มิลลิเมตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส วัดค่า refractive index ด้วย เครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หา พื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time เทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ก่อนหน้านี้ หาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.6.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล และสารอินทรีย์อื่น ๆ โดยใช้เครื่อง HPLC

นำส่วนใสที่ได้จากการเก็บตัวอย่างเพาะเลี้ยงเชื้อทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดซิตริก และกรดบิวทิริก โดยใช้เครื่อง HPLC ใช้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 2 สำหรับทำเป็น Internal standard กรองสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยตัวกรองรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ทำการผสมกรดซิตริกปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิตริก และกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทิริก โดยใช้คอลัมน์ Amines Fermentation Monitor ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้วหาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.6.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำอย่างต่ำ 3 ซ้ำ และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 25) วิเคราะห์ตาราง ANOVA และค่าความแปรปรวนที่ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีของ Duncan ในการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

จากการศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองเพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. โดยการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 เลือกนำตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดไปใช้แทนน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium* G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดความคุม และอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ที่มีกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อย และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อย มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบถั่วเหลือง

จากการวิเคราะห์องค์ทางเคมีประกอบของถั่วเหลือง พบว่ากากถั่วเหลืองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุดคือ ร้อยละ 46.12 องค์ประกอบที่มีรองลงมาคือ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 30.22 ต่อมาคือ ปริมาณความชื้นร้อยละ 9.62, เยื่อใยหยาบร้อยละ 5.57, เถ้าร้อยละ 7.21 และไขมันร้อยละ 1.26 ดังที่แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของกากถั่วเหลือง

องค์ประกอบ	ร้อยละ (ของน้ำหนักกากถั่วเหลืองแห้ง)
ความชื้น	9.62
โปรตีน	46.12
เยื่อใยหยาบ	5.57
เถ้า	7.21
ไขมัน	1.26
คาร์โบไฮเดรต	30.22

หมายเหตุ ความชื้นเป็นร้อยละของน้ำหนักกากถั่วเหลือง
ที่มีองค์ประกอบของกากถั่วเหลืองจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

จากการศึกษางานวิจัยของ Banaszkiewicz (2011) เกี่ยวกับองค์ประกอบของกากถั่วเหลือง พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 43.8-49.9 ปริมาณเถ้าร้อยละ 5.6-7.2 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.55-3.00 และ ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 4.3-7.2 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับตารางที่ 4.1 คือ มีร้อยละของปริมาณโปรตีน 46.12 ร้อยละของปริมาณเถ้า 7.21 ร้อยละของปริมาณไขมัน 1.26 และร้อยละของปริมาณเยื่อใยหยาบ 5.57 นอกจากนี้ยังพบว่าในถั่วเหลืองนั้นมีปริมาณของแป้งอยู่ร้อยละ 4.66 - 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถือเป็นปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของเฮมิเซลลูโลส 50% และปริมาณแพคติน 30% ของเยื่อใยทั้งหมด ซึ่งองค์ประกอบของถั่วเหลืองยังรวมไปถึงกรดอะมิโนจำเป็นที่มีปริมาณมากหลายชนิด เช่น อะดีนีน ชิสเทอีน ไลซีน ลิวซีน วาลีน ทริปโตแฟน เป็นต้น

ในปัจจุบันไบโอเอทานอลและบิวทานอลที่ผลิตจากวัสดุลิกนินเซลลูโลส เป็นอีกทางเลือกที่กำลังเป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับการใช้พลังงานทดแทนเอทานอลและบิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่สามารถนำมาใช้ทดแทนแก๊สโซลีนได้ สารตั้งต้นที่นำมาผลิตเอทานอลและบิวทานอลส่วนใหญ่ได้มาจากแป้งและน้ำตาล ซึ่งมีต้นทุนกระบวนการผลิตสูง งานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้พลังงานทดแทนจากวัสดุเหลือทิ้งจากภาคอุตสาหกรรม เช่น กากถั่วเหลืองที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง ในปัจจุบันมีกากถั่วเหลืองเหลือทิ้งจากกระบวนการการสกัดน้ำมันออกเป็นปริมาณมาก มีมูลค่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนจำพวกไบโอบิวทานอลได้ เนื่องจากในกากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสจำนวนมาก ซึ่งถือว่าสามรถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนชั้นดีในกระบวนการหมักอะซีโทน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE) โดยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. แหล่งคาร์บอนจากกากถั่วเหลืองจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อแข่งขันกับสารตั้งต้นประเภทน้ำตาลที่มีราคาสูงกว่าได้เนื่องจากการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต ABE และทำให้ได้ผลผลิตที่มีศักยภาพในการนำไปเป็นเชื้อเพลิงเหลวในอนาคต (จันทรัสม์ และชมภูนุช, 2559)

4.2 การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์ผสมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

ณัฐพงษ์ และเศรษฐวัชร (2558) จากการศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ ได้ทำการทดลองย่อยกากมันสำปะหลังด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0 - 3.0 โมลาร์ นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดดันไอที่อุณหภูมิ 60, 100 และ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่ากรดซัลฟิวริกสามารถย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ โดยการย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่ต่ำเนื่องจากใช้อุณหภูมิที่ต่ำในย่อย ทำให้มีความร้อนไม่เพียงพอในการย่อยกากมันสำปะหลังร่วมกับกรด โดยจะพบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุด คือ 79.17 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคสอะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลสสามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงสุด 82.37 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเลือกใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการย่อยให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงกว่า

จากงานวิจัยข้างต้นจึงเป็นแนวทางในการนำสารละลายกรดและเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มาประยุกต์ใช้ในการย่อยกากถั่วเหลืองให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุด โดยนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกมาทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ผสม โดยการใช้เอนไซม์ในการย่อยเป็นวิธีที่ให้อัตราการย่อยได้สูงขึ้น ทำให้ได้ปริมาณผลผลิตที่มากขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้กรดและด่าง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการตัดพันธะเปปไทด์สูง โดยเป็นการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนด้วยน้ำ (Light และ Smith, 1963)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองได้นำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกมาย่อยต่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร โดยใช้อัตราส่วน 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* sp. ต่อไป โดยผลของอัตราส่วน ACCELLERASE® 1500 ต่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำ ได้ผลดังตารางที่ 4.2, 4.3 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2

จากตารางที่ 4.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 15.52 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ อัตราส่วน 0.9, 0.8 และ 0.7 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 13.30, 13.48 และ 13.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) และที่อัตราส่วน 0 มิลลิลิตรต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ซึ่งไม่ได้เติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดเท่ากับ 5.95 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในตารางที่ 4.2 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณโปรตีนละลายน้ำมากที่สุด คือ 26.21 กรัมต่อลิตร รองลงมาที่อัตราส่วน 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณโปรตีนละลายน้ำเท่ากับ 24.89 กรัมต่อลิตร และที่อัตราส่วน 0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ซึ่งไม่ได้เติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ให้ปริมาณโปรตีนละลายน้ำน้อยที่สุดเท่ากับ 9.24 กรัมต่อลิตร

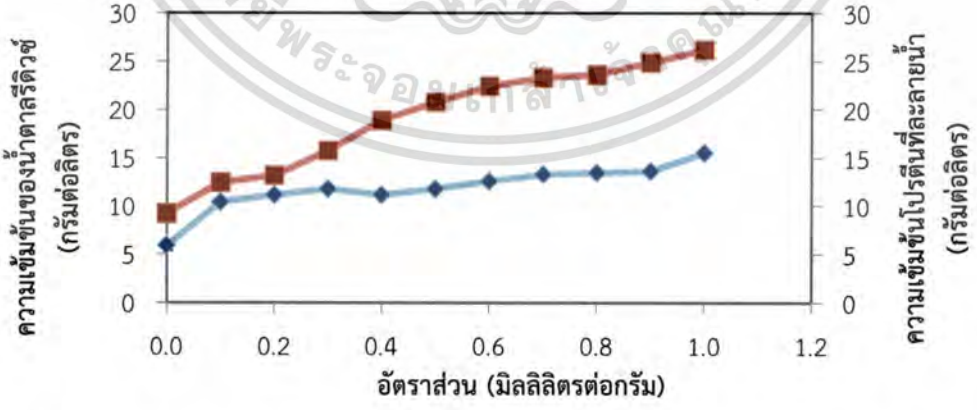
จากผลการเปรียบเทียบการย่อยกากถั่วเหลืองโดยการเติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วนต่างกัน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดคือ อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง จากรูปที่ 4.1 จะเห็นว่าที่อัตราส่วนเริ่มต้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 5.95 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเอนไซม์มากขึ้นจะพบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเอนไซม์มีอัตราส่วนความเข้มข้นที่มากขึ้นส่งผลต่อการย่อยกากถั่วเหลืองที่มากขึ้น ทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมากขึ้นด้วย ในอัตราส่วน 0.9, 0.8 และ 0.7 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน คือ 13.30, 13.48 และ 13.66 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเมื่อใช้อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 15.52 กรัมต่อลิตร และจากรูปที่ 4.1 ที่อัตราส่วนเริ่มต้นมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเท่ากับ 9.24 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนเอนไซม์มากขึ้นจะพบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ละลายน้ำ โดยปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดคือ อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเท่ากับ 26.21 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของอัตราส่วน ACCELLERASE® 1500 ต่อความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์และ ความเข้มข้นโปรตีนละลายน้ำที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 บ่มที่อุณหภูมิ 60 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราส่วน ACCELLERASE® 1500 (มิลลิลิตรต่อกรัมของกากถั่วเหลือง)	**ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)**	**ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (กรัมต่อลิตร)**
0	$5.95^{g}\pm0.58$	$9.24^{k}\pm0.07$
0.1	$10.43^{f}\pm0.31$	$12.44^{j}\pm0.07$
0.2	$11.16^{e}\pm0.06$	$13.22^{i}\pm0.03$
0.3	$11.80^{d}\pm0.09$	$15.76^{h}\pm0.46$
0.4	$11.17^{e}\pm0.08$	$18.88^{g}\pm0.38$
0.5	$11.79^{d}\pm0.30$	$20.78^{f}\pm0.37$
0.6	$12.60^{c}\pm0.23$	$22.44^{e}\pm0.49$
0.7	$13.30^{b}\pm0.08$	$23.33^{d}\pm0.65$
0.8	$13.48^{b}\pm0.19$	$23.63^{c}\pm0.28$
0.9	$13.66^{b}\pm0.02$	$24.89^{b}\pm0.28$
1.0	$15.52^{a}\pm0.07$	$26.21^{a}\pm0.37$

หมายเหตุ เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 เป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง Endoglucanase และเอนไซม์ Beta-Glucosidase โดยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์ Endoglucanase เท่ากับ 2,500 ยูนิต และมีกิจกรรมเอนไซม์ Beta-Glucosidase เท่ากับ 612.5 ยูนิต



รูปที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 (◆ คือ ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองการเปรียบเทียบอัตราส่วนของเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่ใช้ในการย่อยกากถั่วเหลืองเพื่อหาอัตราส่วนที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุด พบว่าอัตราส่วนที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดคือ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง จึงได้นำอัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง มาเปรียบเทียบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเอนไซม์ โดยการใช้เวลาที่แตกต่างกัน คือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ที่บ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วกรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman® No. 1 นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และหาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ ได้ผลดังตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.2

ผลการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ที่ใช้เวลาแตกต่างกันคือ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากตาราง 4.3 จะพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 14.75 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่เวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 10.88 กรัมต่อลิตร และที่เวลา 0 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุด เท่ากับ 10.14 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ จากตารางที่ 4.3 จะพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ เท่ากับ 23.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่เวลา 24 และที่เวลา 0 ชั่วโมง ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำใกล้เคียงกัน เท่ากับ 11.64 และ 11.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

จากผลการเปรียบเทียบการย่อยกากถั่วเหลืองโดยการเติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาแตกต่างกันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุด จากรูปที่ 4.2 (ก) พบว่าเวลาที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดคือ 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 14.75 กรัมต่อลิตร และจากรูป 4.2 (ข) ให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำเท่ากับ 23.02 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือที่เวลา 24 และ 0 ชั่วโมงตามลำดับ กล่าวคือระยะเวลาในการบ่มที่มากขึ้นมีผลกับเอนไซม์ในการย่อยกากถั่วเหลือง ที่ระยะเวลามากขึ้นทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาในการย่อยถั่วเหลืองมากขึ้นทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมากขึ้นเช่นกัน

รัชพล (2555) ทดลองเปรียบเทียบอัตราส่วนเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเอนไซม์ เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จึงใช้เอนไซม์เซลลูเลสใน การย่อยเซลลูโลส โดยเอนไซม์เซลลูเลสทำหน้าที่ตัดพันธะ glycosidic ในเซลลูโลส จึงทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์เซลลูเลสหากเกิดการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส และในการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะทำหน้าที่ตัดพันธะ α-1,4 glycosidic ของอะไมโลสหรืออะไมโลแพคตินแบบสุ่ม ทำให้ได้เป็นสารผสมของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) จำพวกมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเป็นการย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycosidic และพันธะ α-1,6 glycosidic โดยจะตัดกลูโคสครั้งละหนึ่งหน่วยจากปลายด้าน non-reducing เป็นการย่อยแป้งให้ได้กลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (พักตร์ประไพ, 2546) ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการย่อยกากถั่วเหลืองจะเป็นเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้มากขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ และระยะเวลาใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบ่ม จากการทดลองเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสมทำให้เอนไซม์ทำงานได้มีประสิทธิภาพคือ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.3 ผลของเวลาต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำที่ได้จากจากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ความเข้นข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (กรัมต่อลิตร)
0	$10.14^{c}\pm0.05$	$11.51^{c}\pm0.06$
24	$10.88^{b}\pm0.08$	$11.64^{b}\pm0.05$
48	$14.75^{a}\pm0.11$	$23.02^{a}\pm0.14$

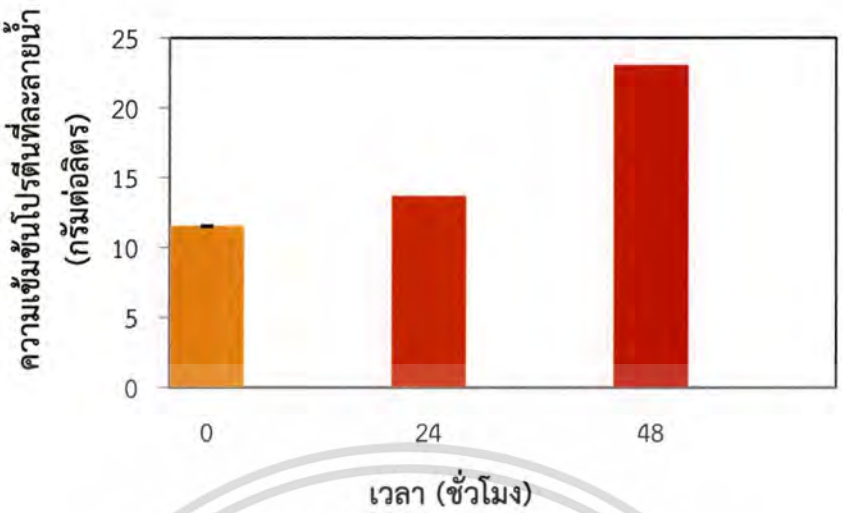
หมายเหตุ เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 เป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง Endoglucanase และเอนไซม์ Beta-Glucosidase โดยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมเอนไซม์Endoglucanase เท่ากับ 2,500 ยูนิต และมีกิจกรรมเอนไซม์ Beta-Glucosidase เท่ากับ 612.5 ยูนิต

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดและเอนไซม์จะพบว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำน้อยกว่ากากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในการย่อยกากถั่วเหลืองนั้นแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่เพิ่มสูงขึ้น จึงใช้สารละลายกรดและสารละลายเอนไซม์ผสมในการย่อยกากถั่วเหลือเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนละลายน้ำเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

(ก)

รูปที่ 4.2 (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และ (ข) ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่เวลาที่แตกต่างกัน (คือ เวลาที่ 0 ชั่วโมง, คือ เวลาที่ 24 ชั่วโมง และ คือ เวลาที่ 48 ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... การทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)

รูปที่ 4.2 (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ และ (ข) ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่เวลาที่แตกต่างกัน (คือ เวลาที่ 0 ชั่วโมง, คือ เวลาที่ 24 ชั่วโมง และ คือ เวลาที่ 48 ชั่วโมง)

4.3 ชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์

จากการทำการวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ได้หลังจากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกส่วนใสกับตะกอนมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1 จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถะสูง ได้ผลดัง ตารางที่ 4.4 จะพบว่าหลังจากการทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และย่อยต่อเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 พบน้ำตาล 4 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 7.39 กรัมต่อลิตร น้ำตาลไซเลส เท่ากับ 4.46 กรัมต่อลิตร น้ำเซลโลไบโอส เท่ากับ 3.35 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตส เท่ากับ 1.95 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ชนิดของน้ำตาลจากส่วนใสที่ได้จากการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
กลูโคส	7.3856 $\pm$ 0.0004
ไซโลส	4.4626 $\pm$ 0.0553
เซลโลไบโอส	3.3462 $\pm$ 0.0012
มอลโตส	1.9509 $\pm$ 0.0001

เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จะพบว่าน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ ที่องค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ ประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นมาจากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบของกากถั่วเหลือง (Aguilar และคณะ, 2007) ซึ่งเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1, 4- glycosidic ในการย่อยเซลลูโลสจึงจำเป็นใช้เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเมื่อเกิดการย่อยที่สมบูรณ์เอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ตัดพันธะ glycosidic ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ถ้าเกิดการย่อยที่ไม่สมบูรณ์จะทำให้ได้น้ำตาลเซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์จากการไฮโดรไลซ์เซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยน้ำตาลเซลโลไบโอส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ β-1, 4- glycosidic (ธนพร และวรรัตน์, 2554) น้ำตาลไซโลสเกิดจากปฏิกิริยาการย่อยไซแลนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเฮมิเซลลูโลส และน้ำตาลมอลโตสเป็นไดแซ็กคาไรด์ ประเภทน้ำตาลโมเลกุลคู่ เกิดจากกลูโคส 2 โมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วย α -1, 4-glycosidic linkage โดยจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่มีทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะตัดพันธะ α-1,4 glycosidic และพันธะ α-1,6 glycosidic (ณัฐพงษ์ และเศรษฐวัชร, 2558) จากการย่อยถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกและเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่มากขึ้นมากกว่าการใช้กรดในการย่อยกากถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว

4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

หลังจากที่ทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนและส่วนใสมาย่อยต่อเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสไปกรองเพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ เพื่อนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองและอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลกลูโคส โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ที่ใช้เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปหมักโดยหัวเชื้อ *Clostridium* G10 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเติมอาหารลงไปเท่ากับปริมาตรตัวอย่างที่เก็บเพื่อให้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณอาหารเท่าเดิม โดยตัวอย่างที่เก็บจะถูกนำไปวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัด HPLC น้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายน้ำ ส่วนตะกอนที่ได้นำไปวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.3 (ข) พบว่า ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงและสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 2.82 โดยชั่วโมงที่ 0 มีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.24 ส่วนในอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย พบว่ามีแนวโน้มความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น โดยในชั่วโมงที่ 0 มีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.13 และในชั่วโมงที่ 120 มีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดเท่ากับ 0.68 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ข) และในอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียว พบว่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มใกล้เคียงกันกับชุดควบคุม โดยชั่วโมงที่ 0 มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ 0.12 และชั่วโมงที่ 120 มีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงที่สุดเท่ากับ 0.62 ดังแสดงในตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ข)

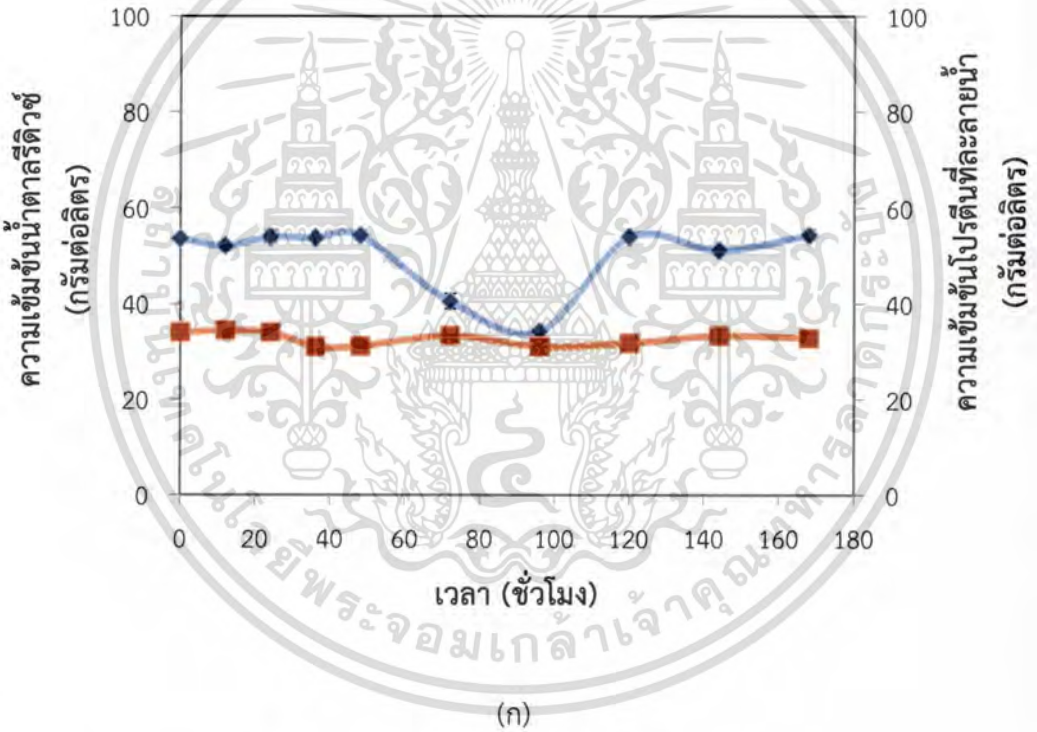
ตารางที่ 4.5 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	OD 600 nm	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
0	5.47^{a}±0.03	0.24^{g} ± 0.00	0.0600^{e} ± 0.0067	53.26^{a} ± 0.51	34.10^{a} ± 0.05
12	5.41^{a}±0.08	0.24^{g} ± 0.01	0.1778^{de} ± 0.0847	51.90^{b} ± 0.47	34.47^{a} ± 0.24
24	4.93^{b}±0.05	0.56^{f} ± 0.01	0.3289^{cd} ± 0.0139	53.40^{a} ± 1.10	34.09^{a} ± 0.23
36	4.95^{b}±0.08	0.88^{d} ± 0.00	0.4911^{bc} ± 0.2267	54.21^{a} ± 0.49	31.07^{d} ± 0.37
48	4.89^{b}±0.15	2.25^{b} ± 0.04	0.7667^{a} ± 0.1568	55.03^{a} ± 1.03	31.18^{d} ± 0.23
72	4.87^{b}±0.18	2.82^{a} ± 0.02	0.8378^{a} ± 0.1567	41.44^{c} ± 1.61	33.43^{b} ± 0.05
96	4.90^{b}±0.20	2.28^{b} ± 0.03	0.6822^{ab} ± 0.0778	34.38^{d} ± 0.24	31.10^{d} ± 0.05
120	4.91^{b}±0.19	1.68^{c} ± 0.05	0.8711^{a} ± 0.0847	54.08^{a} ± 0.61	31.85^{d} ± 0.28
144	4.94^{b}±0.19	0.77^{e} ± 0.00	0.7222^{ab} ± 0.1110	51.36^{b} ± 0.28	33.38^{b} ± 0.24
168	4.96^{b}±0.19	0.73^{e} ± 0.02	0.7267^{ab} ± 0.2384	53.13^{a} ± 1.06	32.89^{c} ± 0.21

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

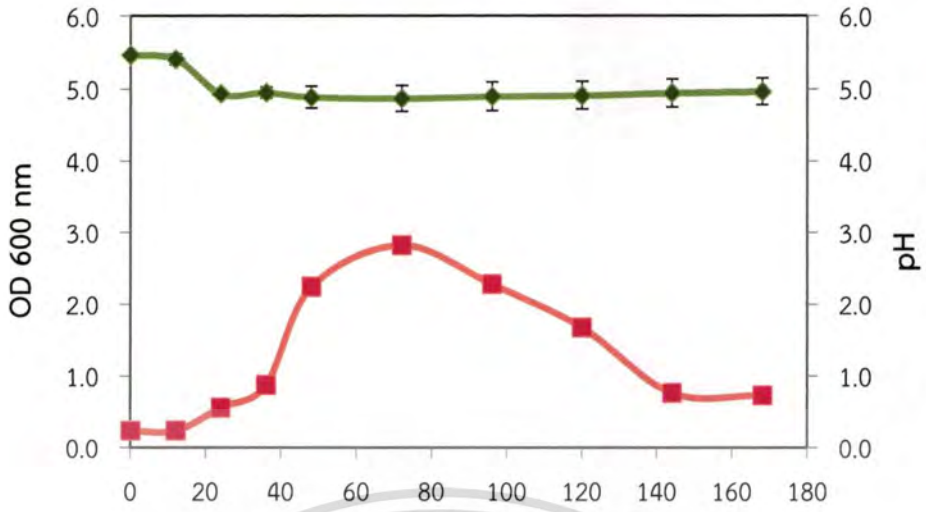
หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม พบว่า ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง จากชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 168 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 0.0667 กรัมต่อลิตร และสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 0.8378 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 168 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.9467 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.5 รูปที่ 4.3 (ค) ส่วนในอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย พบว่า ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.5244 กรัมต่อลิตร โดยชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 0.0600 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ค) ส่วนอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียว พบว่า ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.1156 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 0.4800 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ค)



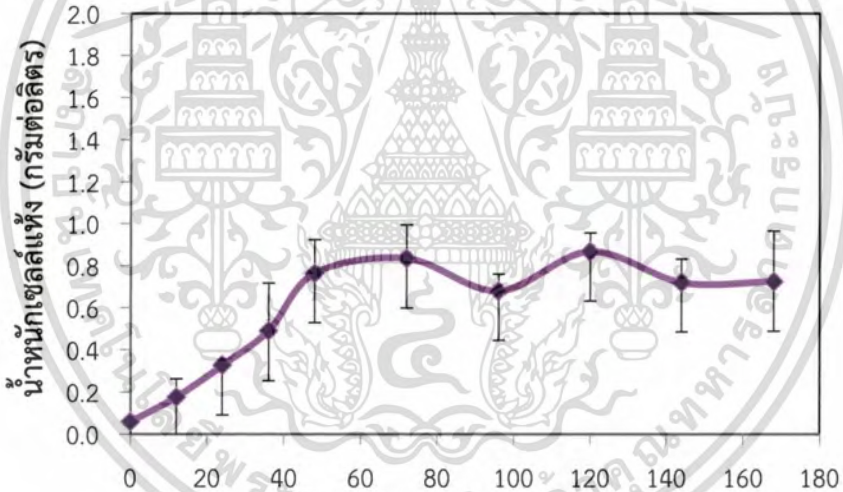
(ก)

รูปที่ 4.3 (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหาร และ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์ G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.3 (ต่อ) (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาล-รีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหาร และ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์ G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.3 (ก) แสดงผลหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ด้วยอาหาร T6 ชุดควบคุม พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มคงที่ในชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 และลดลงเหลือน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 34.38 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหมักต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 และหลังจากชั่วโมงที่ 96 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการหมักเชื้อ และจากผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร T6 ชุดทดลอง ตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ก) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น เท่ากับ 69.61 กรัมต่อลิตร และลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 51.13 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มขึ้นลงตลอดระยะเวลาการหมัก ส่วนผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารชุดทดลองตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ก) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเท่ากับ 52.49 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดเท่ากับ 47.19 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมักและมีแนวโน้มขึ้นลงตลอดระยะเวลาการหมัก สาเหตุที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละชั่วโมงเพิ่มขึ้นและลดลงนั้น อันเนื่องมาจากในการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งจะมีการเติมอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองในอาหารแต่ละชนิดลงไปเพื่อให้ปริมาตรอาหารเท่าเดิม ซึ่งในการเติมอาหารลงไปนั้นส่งผลกระทบเล็กน้อยต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ

ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของอาหาร T6 ชุดควบคุมแสดงในตาราง ที่ 4.5 และรูปที่ 4.3 (ก) จะเห็นว่าปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคงที่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อใช้โปรตีนในปริมาณที่น้อยเช่นเดียวกันกับอาหารชุดทดลองจากตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ก) และตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ก) จากงานวิจัยของ Mechmech และคณะ (2015) ได้กล่าวว่า หากไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับ *Clostridium* G10 จะทำให้เชื้อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อย และจากงานวิจัยของ Kasab (2002) รายงานว่าเชื้อ *Clostridium beijerinckii* NRRL B593 เมื่อเติมยีสต์สกัดและทริปโตนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตตัวทำละลายได้ดีขึ้น

ตารางที่ 4.6 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD 600 nm	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
0	$4.61^{a} \pm 0.02$	$0.13^{i} \pm 0.03$	$0.1200^{e} \pm 0.0570$	$69.61^{c} \pm 1.09$	$24.92^{c} \pm 0.60$
12	$4.63^{a} \pm 0.01$	$0.27^{h} \pm 0.01$	$0.2267^{cde} \pm 0.0200$	$72.83^{b} \pm 0.14$	$24.34^{cde} \pm 0.35$
24	$4.64^{a} \pm 0.03$	$0.36^{g} \pm 0.00$	$0.2889^{cd} \pm 0.0329$	$60.55^{e} \pm 0.55$	$23.57^{f} \pm 0.35$
36	$4.61^{a} \pm 0.02$	$0.39^{f} \pm 0.01$	$0.2022^{de} \pm 0.0473$	$51.13^{i} \pm 0.08$	$23.67^{f} \pm 0.35$
48	$4.47^{c} \pm 0.02$	$0.42^{e} \pm 0.01$	$0.2289^{cde} \pm 0.0543$	$73.91^{a} \pm 0.27$	$24.00d^{ef} \pm 0.18$
72	$4.43^{d} \pm 0.02$	$0.44^{e} \pm 0.01$	$0.3578^{bc} \pm 0.0601$	$53.71^{h} \pm 0.55$	$23.73^{ef} \pm 0.16$

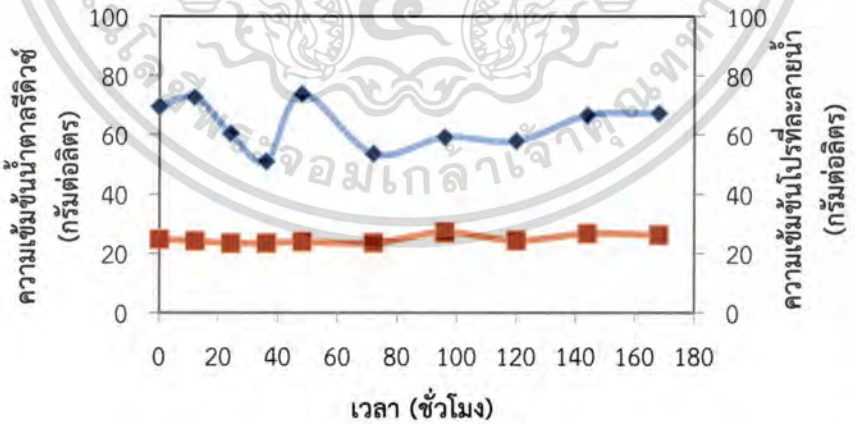
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	pH	OD 600 nm	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
96	$4.46^{cd} \pm 0.04$	$0.56^{b} \pm 0.00$	$0.5244^{a} \pm 0.1167$	$59.33^{f} \pm 0.04$	$27.22^{a} \pm 0.49$
120	$4.57^{b} \pm 0.01$	$0.68^{a} \pm 0.01$	$0.4689^{ab} \pm 0.0767$	$57.97^{g} \pm 0.34$	$24.46^{c} \pm 0.24$
144	$4.44^{cd} \pm 0.01$	$0.52^{c} \pm 0.00$	$0.4400^{ab} \pm 0.1206$	$66.71^{d} \pm 0.76$	$26.85^{ab} \pm 0.16$
168	$4.45^{cd} \pm 0.03$	$0.47^{d} \pm 0.01$	$0.2400^{cde} \pm 0.0706$	$67.35^{d} \pm 0.48$	$26.39^{b} \pm 0.64$

หมายเหตุ a b c d e f และ g ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

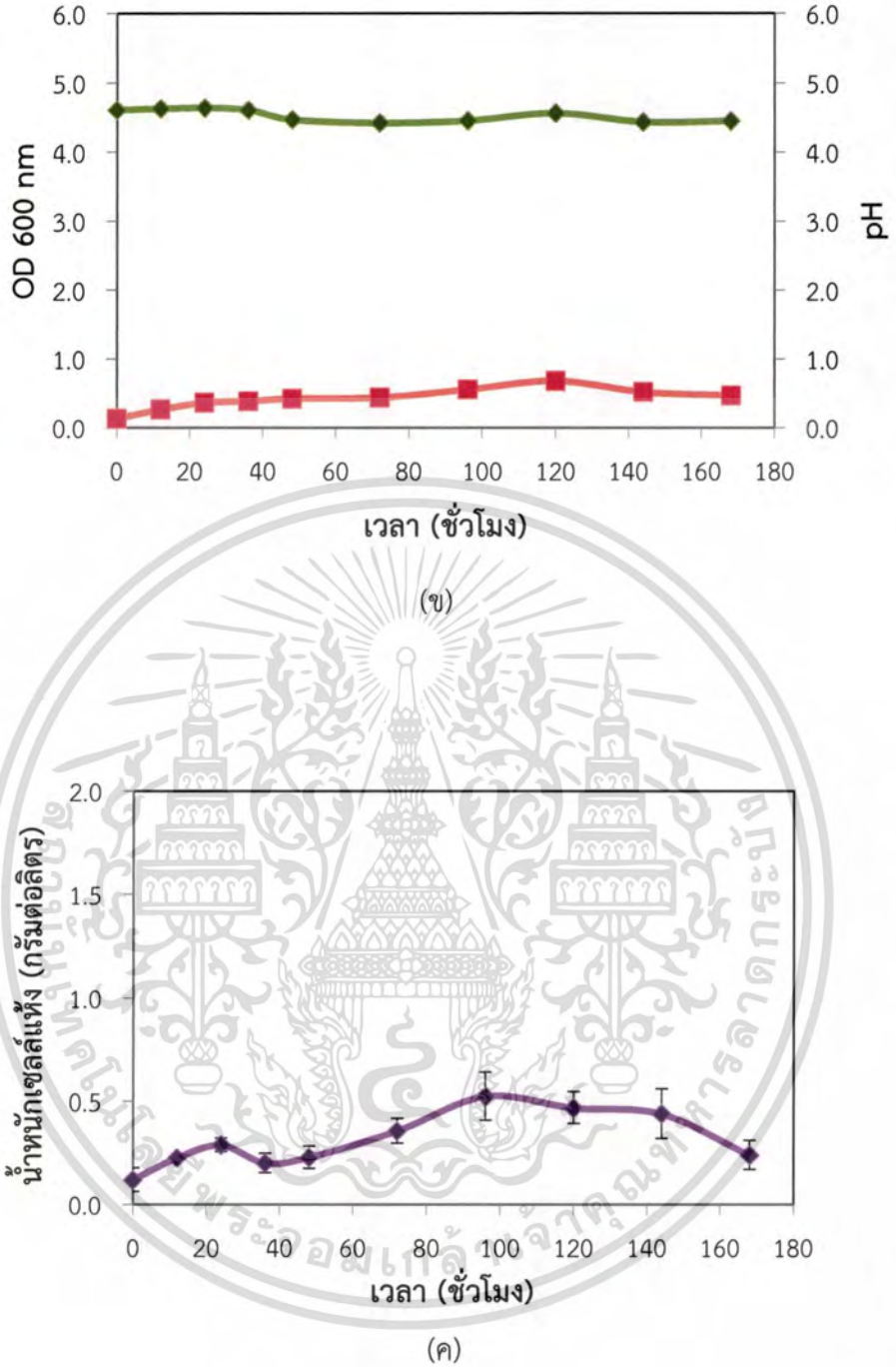
เมื่อเปรียบเทียบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในอาหารชุดควบคุมและอาหารชุดทดลอง พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีความสัมพันธ์กันกับค่าความเป็นกรดด่าง ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในขณะที่ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโต ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมีแนวโน้มคงที่ทั้งในอาหารชุดควบคุมและอาหารชุดทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อใช้โปรตีนปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต



(ก)

รูปที่ 4.4 (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหาร และ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



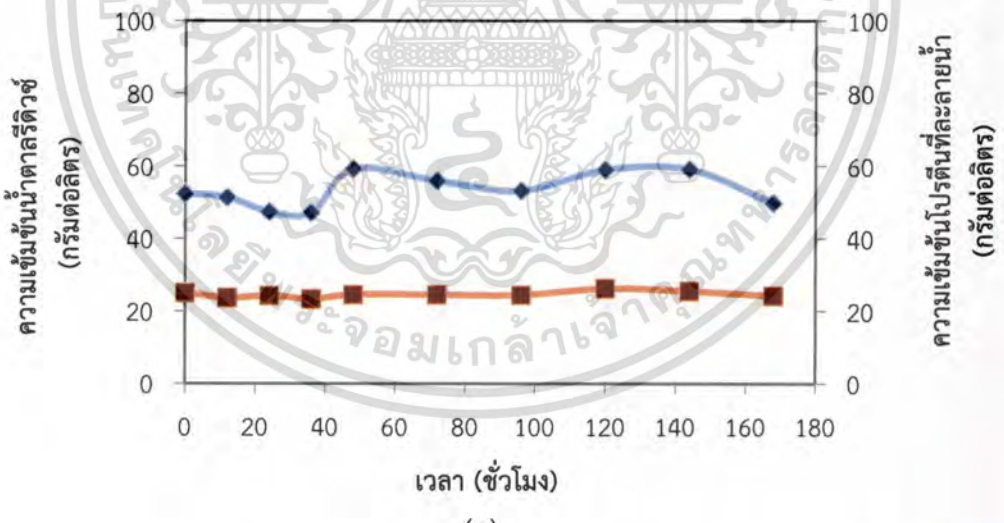
รูปที่ 4.4 (ต่อ) (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหาร และ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	OD 600 nm	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)
0	$4.44^{bc} \pm 0.01$	$0.12^{g} \pm 0.02$	$0.1156^{d} \pm 0.1078$	$52.49^{cd} \pm 0.21$	$25.20^{bc} \pm 0.09$
12	$4.48^{a} \pm 0.01$	$0.21^{f} \pm 0.00$	$0.4044^{ab} \pm 0.0795$	$51.40^{d} \pm 1.10$	$23.82^{e} \pm 0.24$
24	$4.47^{a} \pm 0.01$	$0.44^{e} \pm 0.00$	$0.1800^{d} \pm 0.0353$	$47.46^{f} \pm 1.14$	$24.40^{d} \pm 0.11$
36	$4.46^{ab} \pm 0.01$	$0.54^{c} \pm 0.00$	$0.4800^{a} \pm 0.0067$	$47.19^{f} \pm 0.78$	$23.48^{e} \pm 0.28$
48	$4.41^{c} \pm 0.02$	$0.59^{b} \pm 0.00$	$0.2422^{cd} \pm 0.0500$	$59.28^{a} \pm 0.51$	$24.68^{cd} \pm 0.38$
72	$4.45^{ab} \pm 0.04$	$0.59^{b} \pm 0.01$	$0.3778^{ab} \pm 0.0391$	$55.98^{b} \pm 0.41$	$24.68^{cd} \pm 0.47$
96	$4.47^{a} \pm 0.01$	$0.59^{b} \pm 0.01$	$0.3289^{bc} \pm 0.0102$	$53.22^{c} \pm 0.37$	$24.58^{d} \pm 0.55$
120	$4.42^{c} \pm 0.01$	$0.62^{a} \pm 0.00$	$0.3422^{bc} \pm 0.0509$	$59.06^{a} \pm 0.78$	$26.39^{a} \pm 0.16$
144	$4.28^{d} \pm 0.01$	$0.54^{c} \pm 0.02$	$0.4778^{a} \pm 0.0402$	$59.15^{a} \pm 1.71$	$25.69^{b} \pm 0.37$
168	$4.28^{d} \pm 0.01$	$0.46^{d} \pm 0.00$	$0.2000^{d} \pm 0.1533$	$49.86^{e} \pm 0.24$	$24.37^{d} \pm 0.18$

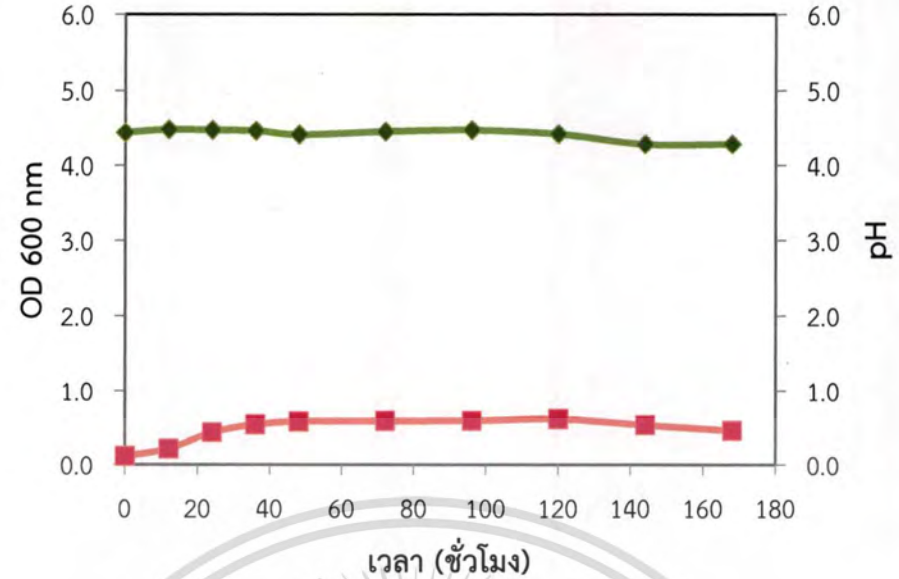
หมายเหตุ a b c d e f และ g ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



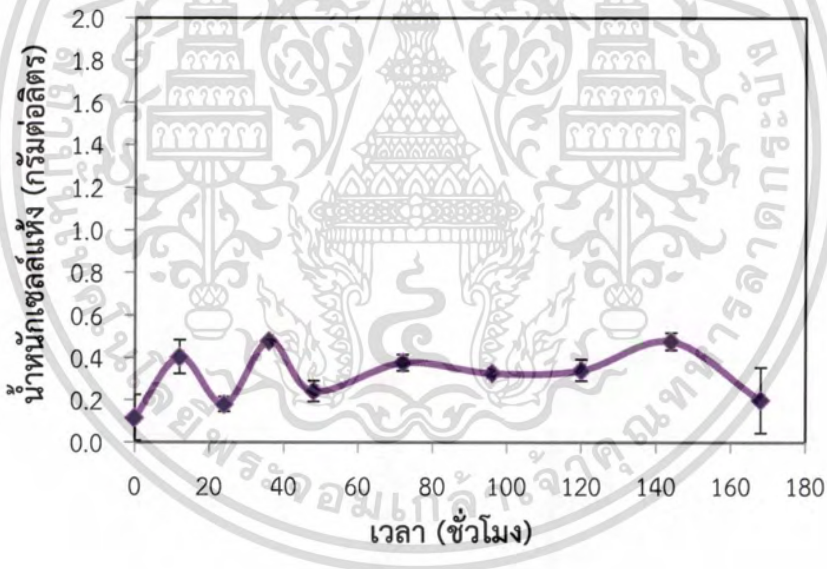
(ก)

รูปที่ 4.5 (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหารและ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์ G10 จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.5 (ต่อ) (ก) ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ความเข้มข้นโปรตีนที่ละลายน้ำ (◆ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ■ คือ ปริมาณโปรตีน) (ข) ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (OD 600 nm) และค่าความเป็นกรดด่าง (◆ คือ ค่าความเป็นกรดด่าง , ■ คือ ความขุ่นของอาหารและ (ค) น้ำหนักเซลล์แห้ง (◆ คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์ G10 จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส วิเคราะห์ปริมาณ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 พบว่า ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.6 (ก) คือผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยผลการทดลองไม่พบความเข้มข้นอะซิโตนตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นเพราะเชื้อผลิตตอะซิโตนได้ในปริมาณน้อยมากจนเครื่อง HPLC ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้ ในส่วนของปริมาณบิวทานอลพบว่า สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 4.33 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดในชั่วโมงแรกของการหมัก เท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 2.49 กรัมต่อลิตรจากนั้นค่อยๆ ลดลงเหลือ 1.60 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณกรดบิวทิริกนั้นมีความเข้มข้นสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 36 เท่ากับ 2.28 กรัมต่อลิตร จากตารางที่ 4.9 และ รูปที่ 4.6 (ข) คือ ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยพบว่ามีปริมาณอะซิโตนสูงสุดในชั่วโมง ที่ 96 เท่ากับ 8.79 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 72 พบว่ามีปริมาณบิวทานอลและเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 1.05 และ 20.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 23.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 และความเข้มข้นของกรดบิวทิริกสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 4.10 และ 4.6 (ค) คือ ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณอะซิโตน สูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.95 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 12.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ขณะเดียวกัน ความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 15.86 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของกรดบิวทิริกสูงสุดเท่ากับ 3.42 กรัมต่อลิตร

เปรียบเทียบการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณความเข้มข้น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลระหว่างอาหารชุดควบคุมและอาหารชุดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่า อาหารชุดควบคุมให้ปริมาณบิวทานอลมากกว่าในอาหารชุดทดลอง ในขณะที่ปริมาณอะซิโตนและเอทานอลของอาหารชุดทดลองมีปริมาณมากกว่าในชุดควบคุม จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า หากเชื้อเจริญเติบโตมากเชื้อจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น แต่หากเชื้อเจริญเติบโตน้อยเชื้อก็จะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ในปริมาณน้อย ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า อาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์มากกว่าอาหารชุดทดลองที่มีส่วนประกอบของอาหาร T6 และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองจากงานวิจัยของ Buakhiaw (2017) ได้ทำการวิเคราะห์สูตรอาหารต่อการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ G10 ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการ โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร โดยมีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ในส่วนประกอบของ อาหารด้วย ผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร T6 เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. ซึ่งเชื้อสามารถผลิตให้ปริมาณไบโอบิวทานอลสูงที่สุด คือ 13.49 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริก ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
0	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$0.3532^{d} \pm 0.0418$	$0.8235^{a} \pm 0.0198$	$2.4889^{a} \pm 0.0512$	$0.4764^{c} \pm 0.0177$
12	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$0.3020^{d} \pm 0.0360$	$0.1759^{d} \pm 0.2535$	$2.2074^{ab} \pm 0.1506$	$0.1433^{c} \pm 0.1694$
24	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$0.5226^{d} \pm 0.1416$	$0.4973^{bc} \pm 0.0290$	$1.9542^{bc} \pm 0.1608$	$1.1574^{b} \pm 0.0833$
36	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$1.7905^{c} \pm 0.4224$	$0.4535^{bc} \pm 0.0074$	$1.6363^{cd} \pm 0.1173$	$2.2810^{a} \pm 0.1802$
48	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$2.7895^{c} \pm 0.6376$	$0.4095^{bc} \pm 0.0912$	$1.4398^{d} \pm 0.1869$	$2.0901^{a} \pm 0.5110$
72	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$4.3327^{a} \pm 0.1184$	$0.3427^{c} \pm 0.0038$	$1.5062^{d} \pm 0.0244$	$2.0988^{a} \pm 0.2966$
96	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$3.1039^{abc} \pm 0.8701$	$0.3593^{c} \pm 0.0563$	$1.4335^{d} \pm 0.3115$	$2.0126^{a} \pm 0.5081$
120	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$2.5587^{bc} \pm 1.5430$	$0.4382^{bc} \pm 0.0419$	$1.5086^{d} \pm 0.1224$	$2.0304^{a} \pm 0.1493$
144	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$3.2241^{ab} \pm 0.8517$	$0.5573^{b} \pm 0.0238$	$1.7507^{cd} \pm 0.2921$	$2.1434^{a} \pm 0.3964$
168	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$2.5745^{bc} \pm 0.9827$	$0.3726^{c} \pm 0.0389$	$1.6037^{d} \pm 0.2439$	$1.7358^{a} \pm 0.4728$

หมายเหตุ a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริก ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 ชุดทดลองจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
0	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.3321^{a} \pm 0.1032$	$4.6422^{b} \pm 1.1493$	$7.8084^{c} \pm 1.9636$	$1.2375^{b} \pm 0.5413$
12	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.3902^{a} \pm 0.2002$	$6.7124^{b} \pm 0.4635$	$8.9568^{c} \pm 3.6653$	$2.4180^{ab} \pm 0.2035$
24	$1.6852^{ab} \pm 1.4676$	$0.3468^{a} \pm 0.2224$	$6.6573^{b} \pm 0.9753$	$13.7746^{bc} \pm 2.2281$	$0.4494^{b} \pm 0.7784$
36	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.3374^{a} \pm 0.1891$	$6.4381^{b} \pm 0.6430$	$13.8843^{bc} \pm 1.3845$	$1.5470^{ab} \pm 0.1400$
48	$5.3017^{ab} \pm 9.1829$	$0.6632^{a} \pm 1.1487$	$10.2564^{b} \pm 1.9848$	$0.0000^{d} \pm 0.0000$	$6.6203^{ab} \pm 6.0033$
72	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$1.0463^{a} \pm 1.2988$	$20.6005^{a} \pm 2.9136$	$23.7451^{a} \pm 2.3050$	$8.7804^{a} \pm 6.0181$
96	$8.7872^{a} \pm 1.7449$	$0.9615^{a} \pm 0.6670$	$10.1824^{b} \pm 0.0303$	$18.8408^{ab} \pm 0.2997$	$1.6815^{ab} \pm 0.0000$
120	$7.4180^{ab} \pm 9.1597$	$0.4145^{a} \pm 0.4346$	$9.4281^{b} \pm 5.8509$	$17.7702^{ab} \pm 5.5274$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$
144	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.5659^{a} \pm 0.8422$	$9.1192^{b} \pm 1.4683$	$12.1630^{bc} \pm 2.4940$	$4.7620^{ab} \pm 2.1133$
168	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.3321^{a} \pm 0.1032$	$4.6422^{b} \pm 1.1493$	$7.8084^{c} \pm 1.9636$	$1.2375^{b} \pm 0.5413$

หมายเหตุ a b c d e และ g ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐา

ตารางที่ 4.10 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ปริมาณกรดบิวทิริก และกรดอะซิตริก ที่วิเคราะห์ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* G10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

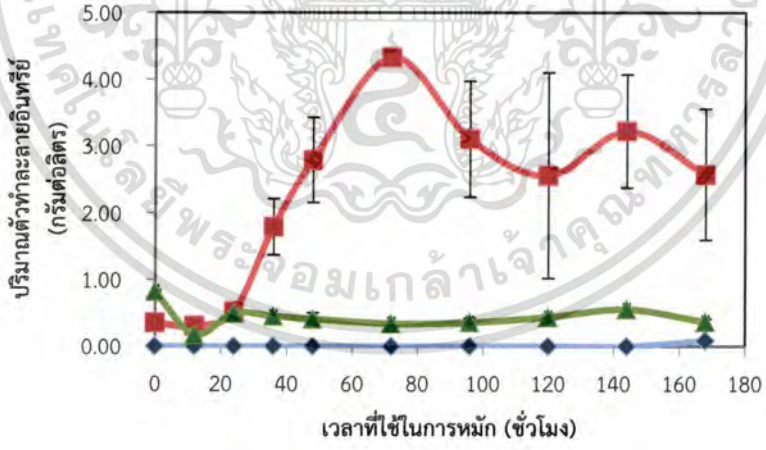
เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทีริก (กรัมต่อลิตร)
0	$0.0000^{a} \pm 0.0000$	$0.1970^{a} \pm 0.2413$	$4.5861^{b} \pm 1.1894$	$3.2870^{b} \pm 3.0620$	$1.3846^{ab} \pm 0.4090$
12	$4.7397^{a} \pm 4.1057$	$0.2020^{a} \pm 0.1435$	$2.3877^{b} \pm 4.1356$	$19.6865^{a} \pm 0.3647$	$2.8500^{ab} \pm 0.1407$
24	$4.504^{a} \pm 7.8816$	$0.6151^{a} \pm 1.0654$	$8.5848^{ab} \pm 2.4164$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$2.4101^{ab} \pm 3.0370$
36	$4.2030^{a} \pm 7.2799$	$0.5846^{a} \pm 0.9668$	$8.4457^{ab} \pm 2.0097$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$2.3259^{ab} \pm 2.8188$
48	N/A	$1.5151^{a} \pm 1.2860$	$10.4846^{ab} \pm 2.2503$	$19.8598^{a} \pm 3.6437$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$
72	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.1443^{a} \pm 0.1585$	$6.1480^{ab} \pm 1.5528$	$2.0527^{b} \pm 3.5553$	$2.2588^{ab} \pm 0.5466$
96	N/A	$0.7354^{a} \pm 1.2737$	$12.7507^{a} \pm 0.6860$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$
120	$18.9477^{a} \pm 4.3682$	$0.8132^{a} \pm 1.4085$	N/A	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$
144	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.0622^{a} \pm 0.1077$	$8.1388^{ab} \pm 2.7668$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$3.4153^{a} \pm 3.0840$
168	$5.3437^{a} \pm 9.2556$	$0.0568^{a} \pm 0.0983$	N/A	$0.0000^{b} \pm 0.0000$	$0.0000^{b} \pm 0.0000$

หมายเหตุ a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์กันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นสูงสุดของ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองที่ใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย

การวิเคราะห์	การทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
อะซิโตน	ชุดควบคุม	72	0.045 ± 0.002
	ชุดทดลอง 1	96	3.629 ± 0.083
	ชุดทดลอง 2	48	5.322 ± 0.045
บิวทานอล	ชุดควบคุม	72	1.227 ± 0.001
	ชุดทดลอง 1	72	0.459 ± 0.021
	ชุดทดลอง 2	48	0.588 ± 0.019
เอทานอล	ชุดควบคุม	0	0.185 ± 0.000
	ชุดทดลอง 1	72	8.896 ± 0.132
	ชุดทดลอง 2	120	7.779 ± 0.146

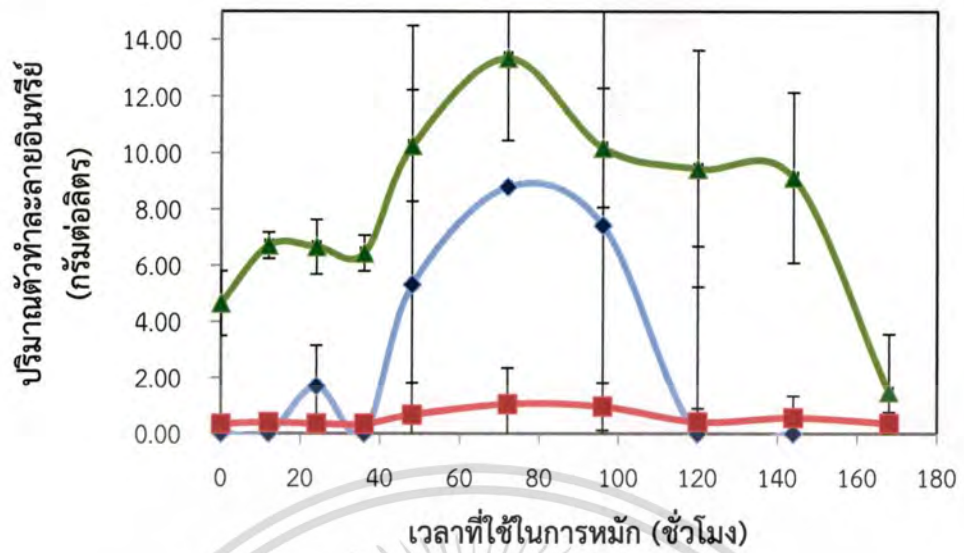
หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร
ชุดทดลองที่ 1 คือ อาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยโดยมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร
ชุดทดลองที่ 2 คือ อาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียวโดยมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร



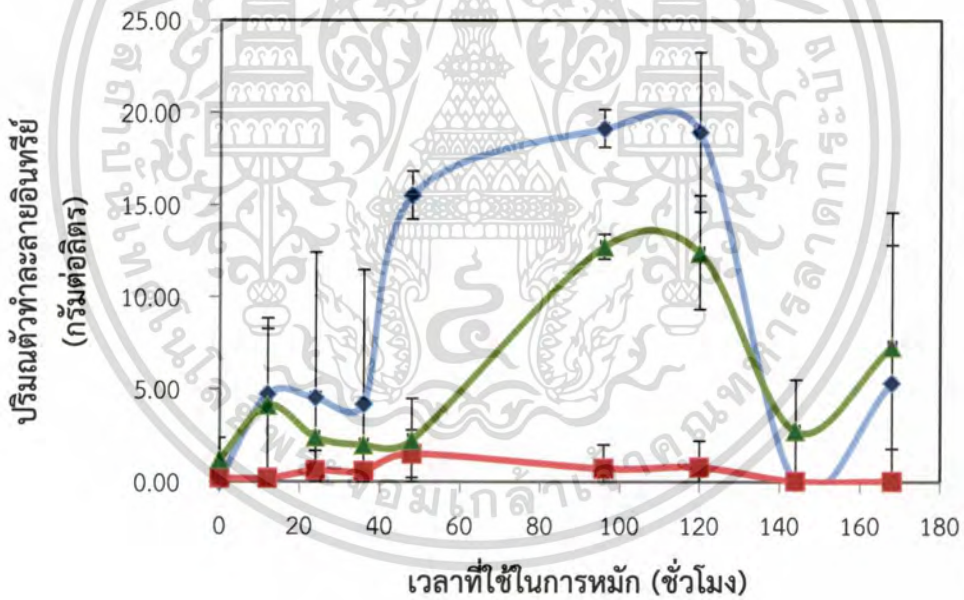
(ก)

รูปที่ 4.6 (ก) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ข) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย และ (ค) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของอาหารชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย (◆ คือ ปริมาณอะซิโตน, ■ คือ ปริมาณบิวทานอล และ ▲ คือ ปริมาณเอทานอล) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.6 (ก) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ข) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย และ (ค) ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของอาหารชุดทดลองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย (◆ คือ ปริมาณอะซิโตน, ■ คือ ปริมาณบิวทานอล และ ▲ คือ ปริมาณเอทานอล) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากงานวิจัยของสุนทรและคณะ (2555) กล่าวว่าสาเหตุที่ทำให้เชื้อผลิตบิวทานอลในปริมาณน้อยเป็นเพราะความเข้มข้นของกรดบิวทิริกมีปริมาณสูงและมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ซึ่งการทดลองในอาหารทั้ง 3 รูปแบบ ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างก่อนเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณัฐพงษ์ และเศรษฐวัชร (2558) จากการศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ พบว่าเมื่อใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.4 โมลาร์ ในการย่อยพบว่า ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง และสารละลายที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของธันยาภรณ์ (2542) ที่ในปัจจุบันนิยมใช้สารละลายกรดในการย่อยแป้ง และโปรตีนให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเล็ก โดยสารละลายกรดจะทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนแตกออก สารละลายกรดจะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง 100 – 180 องศาเซลเซียส ซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยจะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อย หากใช้กรดที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิในการย่อยต่ำเกินไปจะทำให้การเกิดปฏิกิริยาการย่อยที่ดำเนินไปได้ช้า และอาจจะเกิดปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์น้อย แต่หากใช้กรดที่มีความเข้มข้นที่มากเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำเข้มและมีรสขม ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการเช่น เกิดสารเฟอฟูรอล (furfural) จากการทำปฏิกิริยาเคมีอื่น ๆ ของกลูโคสที่ได้จากการย่อยของกรดที่ใช้ (ลีนา, 2556) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดยังทำให้เกิดเกลือจากการปรับความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) เป็นส่วนประกอบรวมอยู่ด้วย จากผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชุดทดลองที่มีกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยทั้ง 2 อาหาร มีผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยเป็นผลมาจากการใช้สารละลายซัลฟิวริกที่เป็นกรดแก่ทำให้เกิดสารเฟอฟูรอลที่มีผลกระทบการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อเจริญเติบโตช้าและใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างไม่เต็มที่ และจากงานวิจัยของ Dong และคณะ (2014) ได้ทำการทดลองเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัด กากถั่วเหลือง และน้ำข้าวโพดหมัก และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. เพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ความเข้มข้นบิวทานอลเท่ากับ 8.9 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นเอทานอลในอาหารทั้ง 3 รูปแบบ พบว่า ใน T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย และอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียวให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าในอาหารชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุนทร และคณะ (2555) โดยกล่าวว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแอมโมเนียมอะซิเตทอยู่จึงทำให้เชื้อนำแอมโมเนียมอะซิเตทไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้จึงทำให้มีปริมาณเอทานอลสูง

จากตารางที่ 4.5, 4.6, 4.7 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยพบว่า ในอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0 มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.47 และหลังจากนั้นเริ่มลดลง และมีแนวโน้มลดลงคงที่ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในขณะเดียวกันค่าความเป็นกรดด่างของอาหาร T6 ชุดทดลอง ในชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 4.61 และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 4.47 และเริ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 120 เช่นเดียวกันกับอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียว สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ อันเนื่องมาจากเมแทบอลิซึมของเชื้อ *Clostridium* sp. โดยในระยะแรกเชื้อจะสร้างกรดบิวทิริกก่อนจึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงและเมื่อเชื้อสร้างตัวทำละลายจะส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความข่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรดด่าง ซึ่งความข่นของอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างลดลงและเพิ่มขึ้นตามเชื้อ จึงส่งผลให้การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการย่อยกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัสดุที่เหลือจากทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* G10 เพื่อการผลิตผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล จากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกากถั่วเหลืองพบว่ามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุดคือ ร้อยละ 46.12 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 30.22 ปริมาณความชื้นร้อยละ 9.62 ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 5.57 ปริมาณเถ้าร้อยละ 7.21 และปริมาณไขมันร้อยละ 1.26

งานวิจัยได้การศึกษาสภาวะการย่อยด้วยกรด และการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย และให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุด โดยนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการบดมาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1 : 10 โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนใสกับตะกอนมาทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสกับเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่อัตราส่วน 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโปรตีนที่ละลายสูงสุด พบว่าที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เท่ากับ 15.52±0.07 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ เท่ากับ 23.02±0.37 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง มาเปรียบเทียบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อย เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 14.75±0.11 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงสุดเท่ากับ 23.02±0.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลจากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรด และเอนไซม์นั้นแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่สูงในการย่อยทำให้องค์ประกอบที่ซับซ้อนในกากถั่วเหลืองจำพวกเยื่อใยแตกออกเม็ดแป้งหลุดออกได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลกเพิ่มสูงขึ้นด้วย ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการย่อยกากถั่วเหลืองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยด้วยสารละลายกรดมีปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง แต่ใช้ระยะเวลานานในกระบวนการย่อย จึงเลือกใช้การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรด และเอนไซม์ผสมเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนละลายน้ำเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ผสมไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถะสูง (Hight Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบน้ำตาล 4 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 7.39±0.0004 กรัมต่อลิตร น้ำตาลไซเลสเท่ากับ 4.46±0.0553 กรัมต่อลิตร น้ำเซลโลไบโอสเท่ากับ 3.35±0.0012 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลมอลโตสเท่ากับ 1.95±0.0001 กรัมต่อลิตร

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium* G10 โดยใช้สูตรอาหาร T6 เป็นชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง และอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตรที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว โดยเพาะเลี้ยงที่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่า ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 0 ถึง 120 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มคงที่ และลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 ส่วนอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย พบว่า ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 0 ถึง 120 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 36 ส่วนในชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย มีความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 0 ถึง 144 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 36 ในส่วนของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำมีแนวโน้มคงที่ในอาหารทั้ง 3 ชนิด

จากผลค่าความเป็นกรดด่างของอาหารทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหาร T6 ชุดควบคุม ในชั่วโมงที่ 24 มีค่าความเป็นกรดด่างลดลงเท่ากับ 4.93 คงที่ ส่วนในอาหารชุดทดลอง T6 ที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย พบว่าค่าความเป็นกรดด่างเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 4.47 ในขณะที่ และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 4.46 และในอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อย ค่าความเป็นกรดด่างลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 4.41 และเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 4.45

จากการวิเคราะห์ปริมาณ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเครื่อง HPLC ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อT6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสไม่พบปริมาณอะซิโตน ปริมาณบิวทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 4.33 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลสูงที่สุดในชั่วโมงแรกของการหมัก เท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตร ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยพบว่ามีปริมาณอะซิโตนสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีค่าท่ากับ 8.79 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 มีค่าเท่ากับ 1.05 กรัมต่อลิตร และ ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 20.60 กรัมต่อลิตร ผลจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยง เชื้อในอาหารชุดทดลองที่เตรียมมาจากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยเพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณอะซิโตนสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.95 กรัมต่อลิตร ปริมาณบิวทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 12.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96

ดังนั้น งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยกากถั่วเหลืองเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ G10 ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยกากถั่วเหลืองคือ การใช้กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซมม์ ACCELLERASE ®1500 ที่อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมกากถั่วเหลือง โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมง ในการย่อย ซึ่งจากผลการทดลองให้ผลปรากฏว่า เชื้อสามารถนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ ดังนั้น การทดลองนี้สามารถนำกากถั่วเหลืองมาใช้เพื่อทดแทนและลดต้นทุนการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับปรุงกระบวนการย่อยกากถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลเพิ่มมากขึ้น
2. ทดลองเลือกใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ มาใช้ในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้น

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: เชื้อเพลิงเหลวที่กาลังจะมาทดแทนบิวทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 22(3): 703-709.

ณัฐพงษ์ ดิฐกุลชัยมงคล และ เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. 2558. การศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์. รายงานวิจัย: สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ธนพร วิชัย และ วรรัตน์ ปัตรประกร. 2554. การผลิตกรดแอล (+) –แลคติกจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว. วารสารวิชาการ: สาขาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 21: 1-5.

ธันยาภรณ์ นาวินวรรณ. 2542. การผลิตแซนแทนกัมจากมันสัมปะหลังโดย *Xanthomonas campestris* TISTR 840. รายงานวิจัย: สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปิยนุช ไพโรจน์กัลยา. 2556. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากพืชโดยการย่อยด้วยเอนไซม์. รายงานวิจัย: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2555. การปรับสภาพผักตบชวาด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับด่างและกระบวนการการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์. วารสารบัณฑิตศึกษา. 45: 174-184.

มูรนีย์ บริบูรณ์สุข. 2557. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน. รายงานวิจัย: สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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 biosystems engineering. 35: 817–826

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Buakhiaw, B. and Sanguanchaipaiwong, V. 2017. Effect of Media on Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by Isolated *Clostridium* spp. Energy procedia. 138: 864-869.

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.

Jones and Woods. 1986. *Clostridium beijerincki* NCIMB 8052, JGI Genome portal. (Online) available : https://genome.jgi.doe.gov/clobe/clobe.home.html. (20 ธ.ค 60)

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

Lee, SY., Park, JH., Jang, SH., Nielsen, LK., Kim, J., and Jung, KS., 2008. Fermentative Butanol Production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering, 101(2): 209-28

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biological Chemistry, Department of Pharmacology, Washington University. 193: 265-275.

Luque, R., Lin, C., Wilson, K., and Clark, J. 2006. Butanol. Handbook of Biofuels Production, Woodhead Publishing. 475.

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. Analysis Chemistry. 3: 426-428.

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

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

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

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

- อบกลูโคสที่ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น เพื่อทิ้งให้เย็น
- ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

คำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000\ \mu g/mL\ (V_1) = (100\ \mu g/mL)(5\ mL)$$

$$V_1 = 0.5\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้กลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

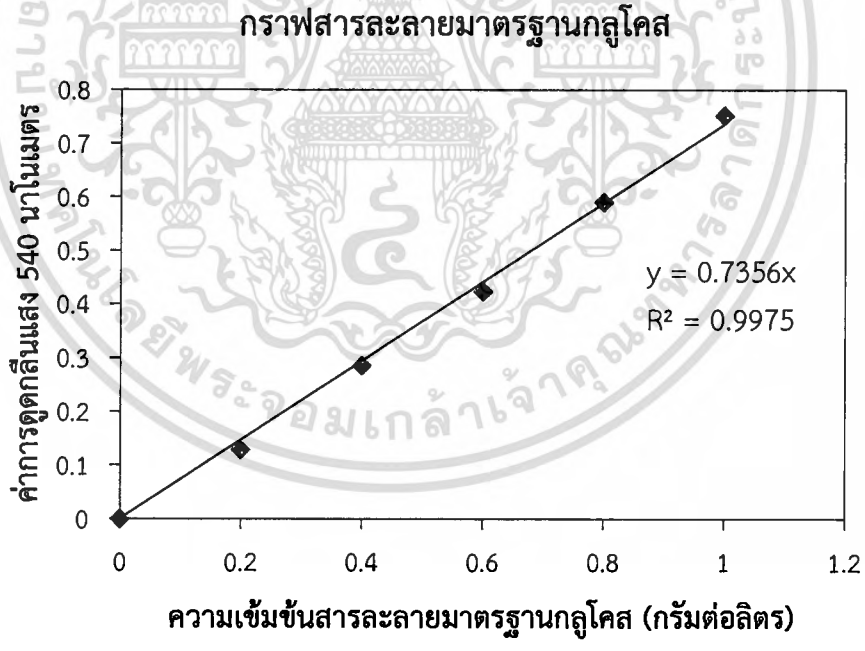
การเตรียมสารละลาย DNS (Dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
- เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย
- คนให้สารละลายเข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส
- เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเททลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโกสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0	0.0000
100	0.1290
200	0.2860
400	0.4235
600	0.5900
800	0.7520
1000	0.0000



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

คำนวณหาปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ต้องใช้ ได้จากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล

d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 1.84)

x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 98)

MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 98.08)

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

$$= 1.84 \text{ นอร์มอล}$$

นำค่าความเข้มข้นเข้าสมการ

$C_1V_1 = C_2V_2$

$18.4\ M\ (V_1) = (0.1\ N)\ (1000\ mL)$

$V_1 = 5.43\ mL$

สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ใช้กรดซัลฟิวริก 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5.43 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

คำนวณหาปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ต้องใช้ ได้จากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล

d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 1.84)

x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 98)

MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 98.08)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$= 1.84 \text{ โมลาร์}$$

นำค่าความเข้มข้นเข้าสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$18.4\ M\ (V_1) = (1\ M)(1000\ mL)$$
$$V_1 = 54.35\ mL$$

ดังนั้น ดูดกรดซัลฟิวริกมา 54.35 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 โมลาร์

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1\ g/L)\ (V_1) = (0.5\ g/L)\ (10\ mL)$$

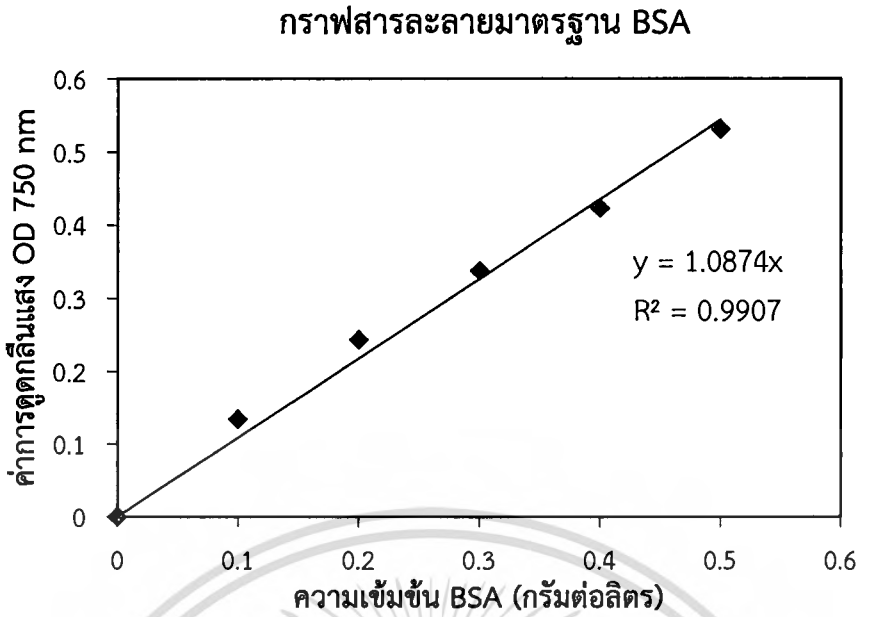
$$V_1 = 0.5\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ใช้สารละลาย BSA 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี ลอว์รี - ฟอลิน (Lowry - Folin method)

ความเข้มข้นสารละลาย BSA (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
0	0.0000
0.1	0.2040
0.2	0.2435
0.3	0.3375
0.4	0.4230
0.5	0.5310

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ HPLC

การเตรียมสารละลายกรดอะซิติก (Acetic acid) มาตรฐาน

ความเข้มข้นของกรดอะซิติกคือ 100 % มวลโมเลกุล 60.05 กรัมต่อโมล และความหนาแน่นที่ 25 องศาเซลเซียส คือ 1.05 กรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นกรดอะซิติกจากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล
d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 1.05)
x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 100)
MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 60.05)

$$C = \frac{(10)(1.05)(100)}{60.05}$$

C = 17.49 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Stock กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

$17.49\ M\ (V_1) = (1\ M)\ (50\ mL)$

$V_1 = 2.86\ mL$

เตรียมสารละลาย Standard กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

$1\ M\ (V_1) = (0.2\ M)\ (10\ mL)$

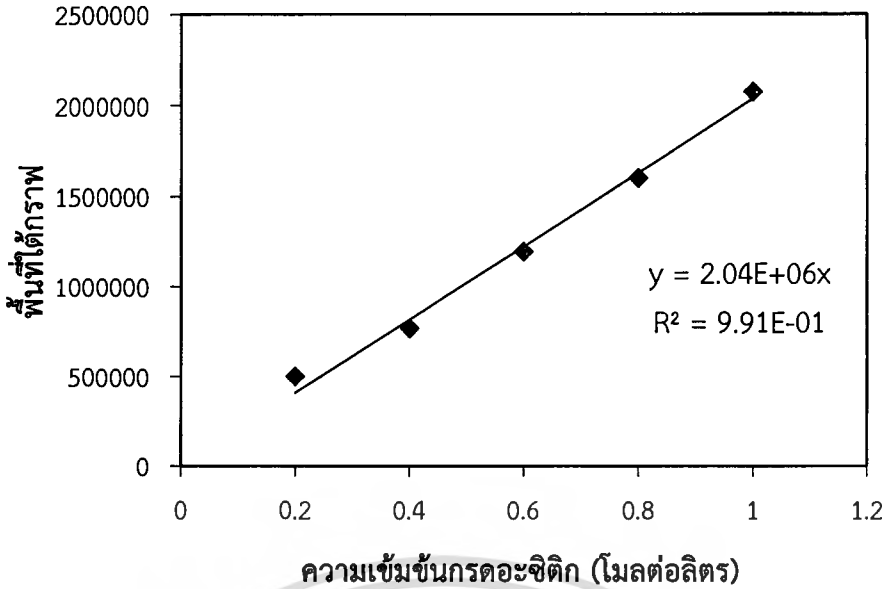
$V_1 = 2\ mL$

ตัวอย่าง สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดอะซิติก ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์(Columnoven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (โมลต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟกรดอะซิติก
0	0
0.2	501148
0.4	768057
0.6	1194813
0.8	1602421
1.0	2075697

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดอะซิติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริก (Butyric acid) มาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดบิวทิริกคือ 99% มวลโมเลกุล 88.11 กรัมต่อโมล ความหนาแน่นที่ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.958 กรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นกรดบิวทิริกจากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล

d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 0.958)

x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 99)

MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 88.11)

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

C = 10.76 โมลาร์

เตรียมสารละลาย Stock กรดบิวทิริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

10.76 M (V_1) = (1 M) (50 mL)

V_1 = 4.65 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Standard กรดบิวทิริกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\ M\ (V_1) = (0.2\ M)\ (10\ mL)$$

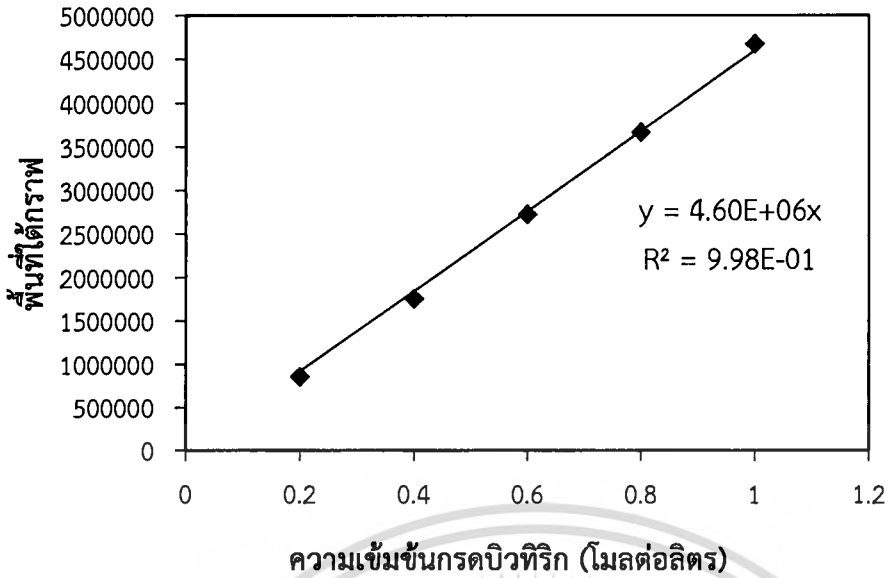
$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดบิวทิริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.4 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นกรดบิวทิริกมาตรฐาน (โมลต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟกรดบิวทิริก
0	0
0.2	858000
0.4	1755486
0.6	2726710
0.8	3667097
1.0	4676175

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดบิวทิริก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายอะซิโตน (Acetone) มาตรฐาน

ความเข้มข้นอะซิโตนคือ 99.98% มวลโมเลกุล 58.05 กรัมต่อโมล ความหนาแน่นที่ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.791 กรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นอะซิโตนจากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล

d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 0.791)

x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 99.98)

MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 58.05)

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

C = 13.62 โมลาร์

เตรียมสารละลาย Stock อะซิโตนความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

13.62 M (V_1) = (1 M) (50 mL)

V_1 = 3.67 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Standard อะซิโตนความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1\ M\ (V_1) = (0.2\ M)\ (10\ mL)$$

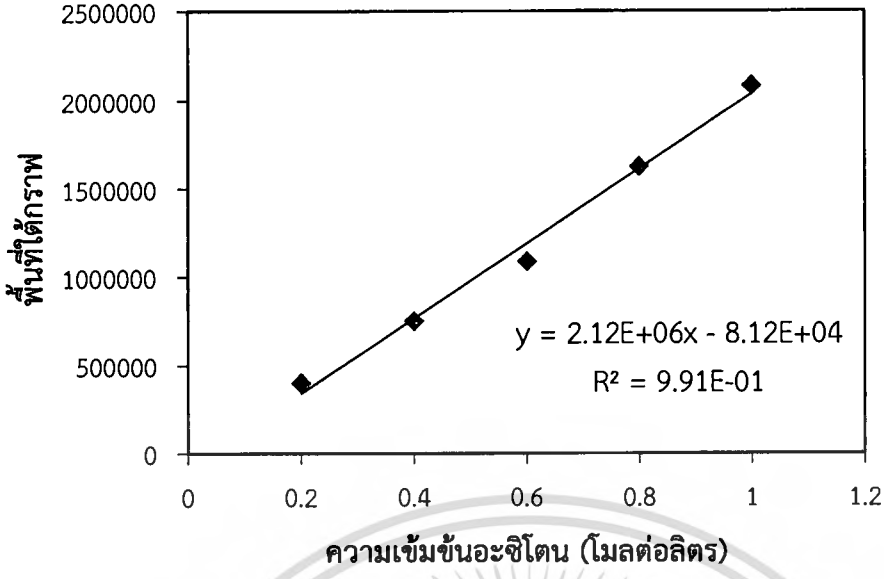
$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลายอะซิโตนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้อะซิโตนความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.5 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (โมลต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟอะซิโตน
0	0
0.2	401156
0.4	751591
0.6	1088858
0.8	1625715
1.0	2082718

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายบิวทานอล (Butanol) มาตรฐาน

ความเข้มข้นบิวทานอลคือ 99.4% มวลโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล ความหนาแน่นที่ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.81 กรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นบิวทานอลจากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล
d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 0.81)
x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 99.4)
MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 74.12)

$$C = \frac{(10)(0.81)(99.4)}{74.12}$$

$$C = 10.86 \text{ โมลาร์}$$

เตรียมสารละลาย Stock บิวทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10.86 \text{ M } (V_1) = (1 \text{ M}) (50 \text{ mL})$$

$$V_1 = 4.6 \text{ mL}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Standard บิวทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

$1\ M\ (V_1) = (0.2\ M)\ (10\ mL)$

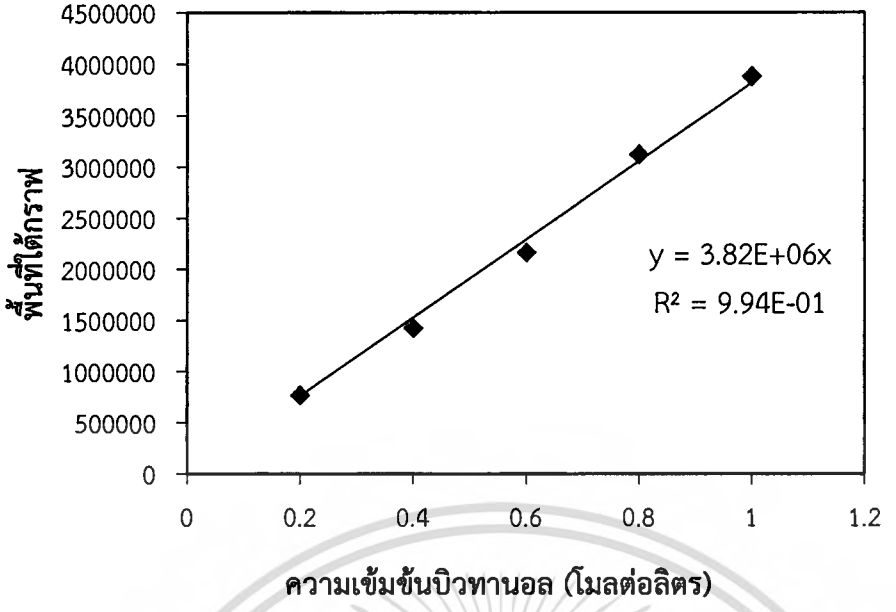
$V_1 = 2\ mL$

ตัวอย่าง สารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้บิวทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.6 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นบิวทานอลมาตรฐาน (โมลต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล
0	0
0.2	770367
0.4	1426273
0.6	2165620
0.8	3124896
1.0	3883908

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายเอทานอล (Ethanol) มาตรฐาน

ความเข้มข้นเอทานอลคือ 99.5% มวลโมเลกุล 46.08 กรัมต่อโมล ความหนาแน่นที่ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นเอทานอลจากสูตร

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยโมลาร์หรือนอร์มอล

d = ความหนาแน่น (มีค่าเท่ากับ 0.789)

x = เปอร์เซ็นต์ของกรด (มีค่าเท่ากับ 99.5)

MW = มวลโมเลกุล (มีค่าเท่ากับ 46.08)

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

C = 17.04 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Stock เอทานอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

17.04 M (V_1) = (1 M) (50 mL)

V_1 = 2.94 mL

เตรียมสารละลาย Standard เอทานอลความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

1 M (V_1) = (0.2 M) (10 mL)

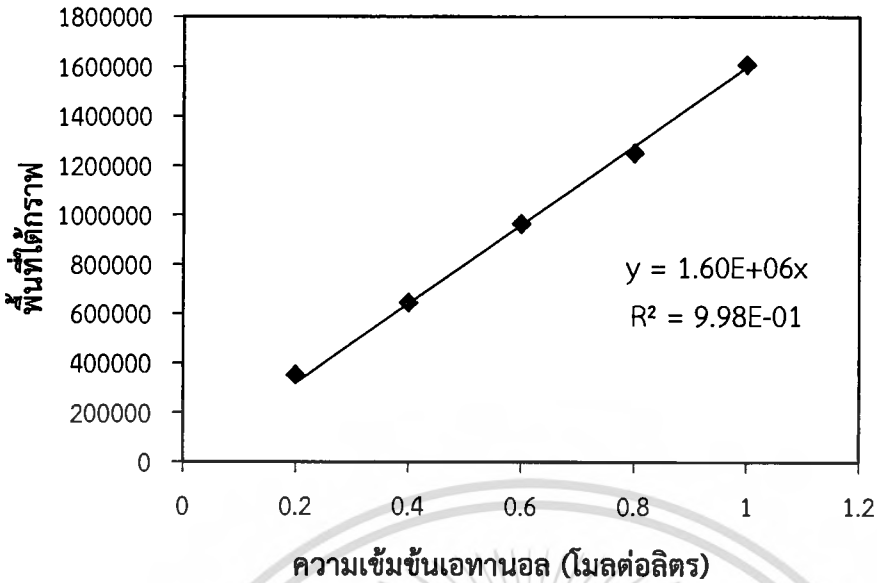
V_1 = 2 mL

ตัวอย่าง สารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้เอทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.7 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โมลต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล
0	0
0.2	352981
0.4	645211
0.6	964421
0.8	1252083
1.0	1609429

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

การเตรียมน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย Stock 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Standard น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10\ g/L\ (V_1) = (2\ g/L)(10\ mL)$$

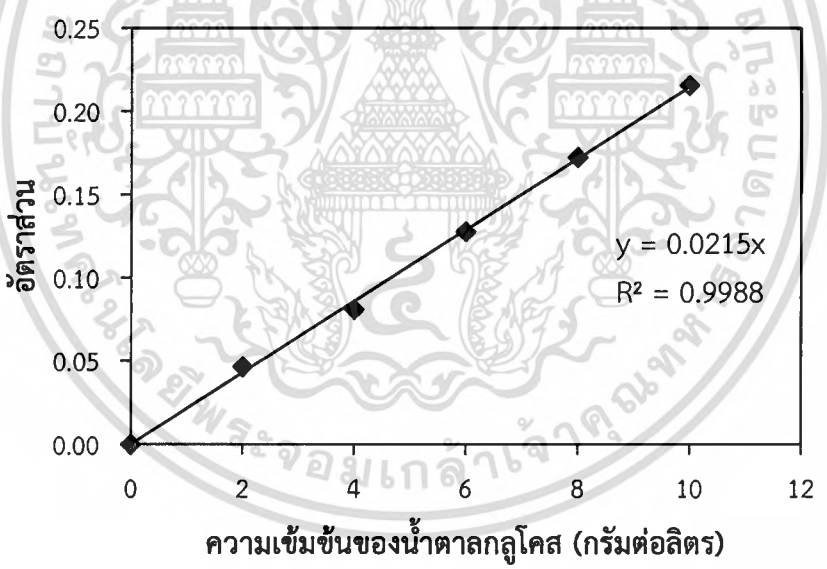
$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.8 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการ ไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลกลูโคส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลกลูโคสต่อพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
0	0	0	0
2	177036	3812807	0.046432
4	312976	3863136	0.081016
6	489202	3827146	0.127824
8	665165	3848545	0.172835
10	827640	3835249	0.215798



รูปที่ ก.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC

การเตรียมน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย Stock 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลไซโลส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Standard น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

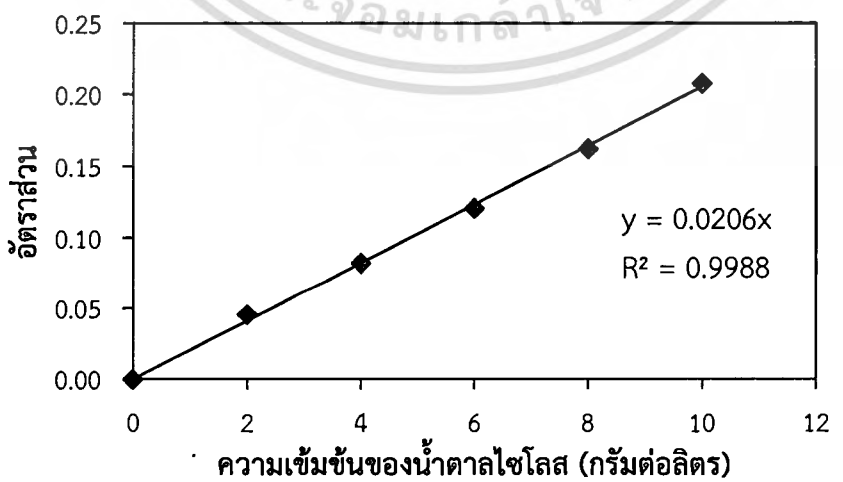
10 g/L (V_1) = (2 g/L) (10 mL)

V_1 = 2 mL

ตัวอย่าง สารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้ไซโลสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.9 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการ ไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลไซโลส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลไซโลสต่อพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
0	0	0	0
2	176034	3868753	0.04550148
4	315318	3825275	0.08243015
6	465368	3852699	0.12079013
8	618668	3811534	0.1623147
10	783793	3772153	0.20778399



รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย Stock 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลเซลโลไบโอส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Standard น้ำตาลเซลโลไบโอสความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10\ g/L\ (V_1) = (2\ g/L)(10\ mL)$$

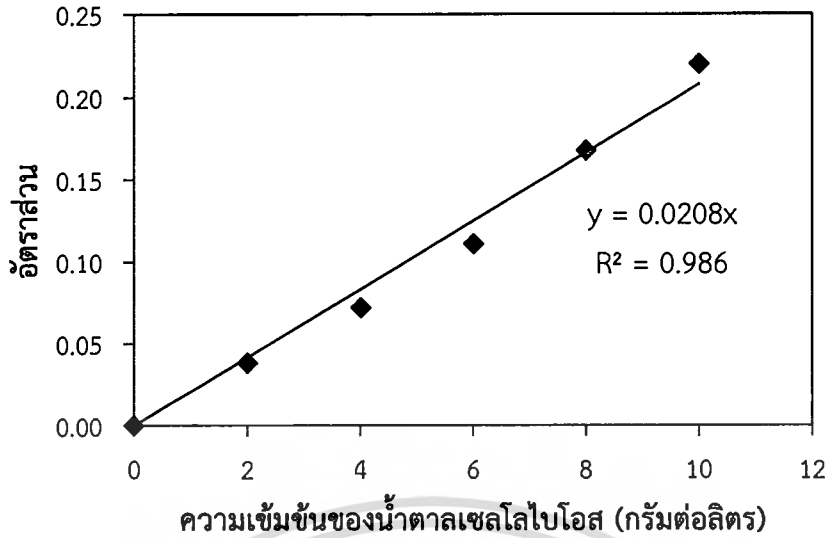
$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้เซลโลไบโอสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.10 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการ ไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลเซลโลไบโอส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลเซลโลไบโอสต่อพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
0	0	0	0
2	144641	3785657	0.038208
4	271495	3760618	0.072194
6	416206	3750620	0.11097
8	624878	3724914	0.167756
10	814822	3701068	0.220159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.10 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย Stock 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำตาลมอลโตส 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย Standard น้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10\ g/L\ (V_1) = (2\ g/L)\ (10\ mL)$$

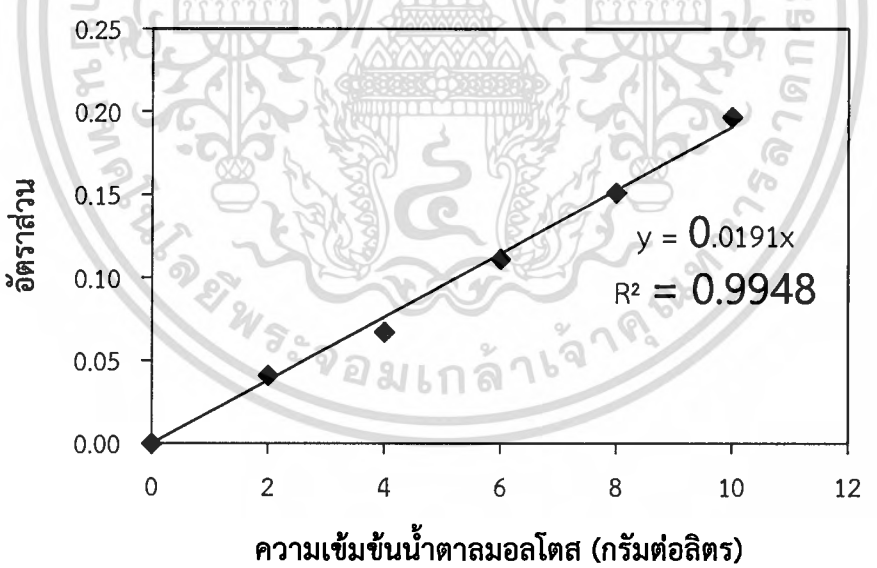
$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่าง สารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้มอลโตสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.11 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน Amines® FermentationMonitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการ ไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลมอลโตส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลมอลโตสต่อพื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
0	0	0	0
2	153809	3726332	0.041276
4	249425	3701988	0.067376
6	405325	3633024	0.111567
8	552455	3650872	0.151321
10	708615	3599603	0.196859



รูปที่ ก.11 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย Internal standard

เตรียมสารละลายกรดซิตริก 2% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดซิตริก 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เพื่อใช้เป็น Internal standard ของสารละลายมาตรฐานกรดอินทรีย์และสารละลายมาตรฐานอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล 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 มิลลิโมลาร์ โดยไมโครปิเปตกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 0.272 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ากลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร และนำไปไล่คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง UltraSonicator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณอัตราส่วนเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	179.797	10	17.980	331.258	.000
.Within Groups	1.194	22	.054		
Total	180.991	32			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

อัตราส่วนเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	5.9452						
0.1	3		10.4313					
0.2	3			11.1564				
0.4	3			11.1654				
0.5	3				11.6911			
0.3	3				11.7999			
0.6	3					12.5974		
0.7	3						13.3043	
0.8	3						13.4765	
0.9	3						13.6578	
1.0	3							15.5247
Sig.		1.000	1.000	.962	.573	1.000	.092	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟิวริกต่อปริมาณอัตราส่วนเอนไซม์ ACCELLERASE®1500

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2163.867	10	216.387	1798.635	.000
Within Groups	2.647	22	.120		
Total	2166.513	32			

เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

อัตราส่วนเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	3	9.23916										
0.1	3		12.43946									
0.2	3			24.00221								
0.3	3				24.61529							
0.4	3					25.28968						
0.5	3						27.15959					
0.6	3							29.42799				
0.7	3								30.99136			
0.8	3									33.22911		
0.9	3										34.54724	
1.0	3											35.31359
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ ACCELLERASE®1500 ในอัตราส่วน 1.0 ใน ระยะเวลาที่แตกต่างกันเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยกากถั่วเหลือง

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.594	2	4.797	78.606	.000
Within Groups	.366	6	.061		
Total	9.960	8			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	10.141381		
24	3		10.884539	
48	3			12.606489
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่คาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
พีเอช	Between Groups	1.317	9	.146	6.736	.000
	Within Groups	.435	20	.022		
	Total	1.752	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
72	3	4.8667	
48	3	4.8867	
96	3	4.8967	
120	3	4.9100	
24	3	4.9333	
144	3	4.9433	
36	3	4.9500	
168	3	4.9633	
12	3		5.4067
0	3		5.4667
Sig.		.489	.624

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	5.4667	.03215	.01856	5.3868	5.5465	5.43	5.49
12	3	5.4067	.07572	.04372	5.2186	5.5948	5.32	5.46
24	3	4.9333	.04933	.02848	4.8108	5.0559	4.90	4.99
36	3	4.9500	.07810	.04509	4.7560	5.1440	4.86	5.00
48	3	4.8867	.15308	.08838	4.5064	5.2669	4.71	4.98
72	3	4.8667	.17898	.10333	4.4221	5.3113	4.66	4.97
96	3	4.8967	.19630	.11333	4.4090	5.3843	4.67	5.01
120	3	4.9100	.19053	.11000	4.4367	5.3833	4.69	5.02
144	3	4.9433	.19348	.11170	4.4627	5.4240	4.72	5.06
168	3	4.9633	.18502	.10682	4.5037	5.4230	4.75	5.08
Total	30	5.0223	.24577	.04487	4.9306	5.1141	4.66	5.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OD 600 nm	Between Groups	23.611	9	2.623	4202.256	.000
	Within Groups	.012	20	.001		
	Total	23.624	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	.2397						
12	3	.2407						
24	3		.5597					
168	3			.7320				
144	3			.7677				
36	3				.8760			
120	3					1.6750		
48	3						2.2450	
96	3						2.2833	
72	3							2.8233
Sig.		.961	1.000	.096	1.000	1.000	.075	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.2397	.00153	.00088	.2359	.2435	.24	.24
12	3	.2407	.00681	.00393	.2238	.2576	.23	.25
24	3	.5597	.00709	.00410	.5420	.5773	.55	.57
36	3	.8760	.00458	.00265	.8646	.8874	.87	.88
48	3	2.2450	.04444	.02566	2.1346	2.3554	2.20	2.28
72	3	2.8233	.01607	.00928	2.7834	2.8633	2.81	2.84
96	3	2.2833	.03403	.01965	2.1988	2.3679	2.25	2.31
120	3	1.6750	.04924	.02843	1.5527	1.7973	1.62	1.72
144	3	.7677	.00153	.00088	.7639	.7715	.77	.77
168	3	.7320	.01744	.01007	.6887	.7753	.72	.75
Total	30	1.2442	.90256	.16478	.9072	1.5813	.23	2.84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง	Between Groups	2.219	9	.247	12.950	.000
	Within Groups	.381	20	.019		
	Total	2.599	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.060000				
12	3	.177800	.177800			
24	3		.328867	.328867		
36	3			.491133	.491133	
96	3				.682233	.682233
144	3				.722233	.722233
168	3				.726667	.726667
48	3					.766667
72	3					.837767
120	3					.871100
Sig.		.308	.195	.165	.068	.152

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.060000	.0067000	.0038682	.043356	.076644	.0533	.0667
12	3	.177800	.0846973	.0489000	-.032600	.388200	.0800	.2267
24	3	.328867	.0138911	.0080200	.294359	.363374	.3133	.3400
36	3	.491133	.2266825	.1308752	-.071977	1.054244	.2667	.7200
48	3	.766667	.1568063	.0905322	.377138	1.156195	.6133	.9267
72	3	.837767	.1566619	.0904488	.448597	1.226936	.6800	.9933
96	3	.682233	.0778707	.0449587	.488792	.875675	.6133	.7667
120	3	.871100	.0846973	.0489000	.660700	1.081500	.7733	.9200
144	3	.722233	.1110489	.0641141	.446373	.998094	.6333	.8467
168	3	.726667	.2384538	.1376714	.134315	1.319019	.4733	.9467
Total	30	.566447	.2993818	.0546594	.454656	.678238	.0533	.9933

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำตาลรีดิวซ์	Between Groups	1310.410	9	145.601	201.670	.000
	Within Groups	14.440	20	.722		
	Total	1324.850	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
96	3	34.3524			
72	3		40.5797		
144	3			51.2681	
12	3			52.1739	
0	3				53.6232
36	3				53.8044
24	3				54.0308
120	3				54.0308
48	3				54.3025
168	3				54.3478
Sig.		1.000	1.000	.207	.365

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	53.6232	.51442	.29700	52.3453	54.9011	53.26	54.21
12	3	52.1739	.47066	.27173	51.0048	53.3431	51.90	52.72
24	3	54.0308	1.09824	.63407	51.3026	56.7589	53.40	55.30
36	3	53.8044	.48988	.28283	52.5874	55.0213	53.26	54.21
48	3	54.3025	1.02879	.59397	51.7469	56.8582	53.13	55.03
72	3	40.5797	1.60956	.92928	36.5813	44.5781	38.72	41.58
96	3	34.3524	.23856	.13773	33.7598	34.9450	34.10	34.58
120	3	54.0308	.61271	.35375	52.5088	55.5528	53.40	54.62
144	3	51.2681	.28284	.16330	50.5655	51.9708	50.95	51.49
168	3	54.3478	1.06118	.61267	51.7117	56.9840	53.13	55.03
Total	30	50.2514	6.75903	1.23402	47.7275	52.7752	34.10	55.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
โปรตีนที่ละลายน้ำ	Between Groups	48.917	9	5.435	111.611	.000
	Within Groups	.974	20	.049		
	Total	49.891	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
36	3	31.0680				
96	3	31.0986				
48	3	31.1753				
120	3		31.8497			
168	3			32.8919		
144	3				33.3824	
72	3				33.4284	
24	3					34.0874
0	3					34.1028
12	3					34.4706
Sig.		.580	1.000	1.000	.801	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	34.1028	.05312	.03067	33.9708	34.2347	34.07	34.16
12	3	34.4706	.23600	.13625	33.8843	35.0569	34.21	34.67
24	3	34.0874	.22682	.13096	33.5240	34.6509	33.93	34.35
36	3	31.0680	.37448	.21620	30.1377	31.9982	30.81	31.50
48	3	31.1753	.22990	.13273	30.6042	31.7464	30.95	31.41
72	3	33.4284	.04595	.02653	33.3142	33.5425	33.38	33.47
96	3	31.0986	.05312	.03067	30.9667	31.2306	31.04	31.13
120	3	31.8497	.27718	.16003	31.1611	32.5382	31.59	32.14
144	3	33.3824	.23891	.13793	32.7889	33.9758	33.11	33.52
168	3	32.8919	.21235	.12260	32.3644	33.4194	32.65	33.01
Total	30	32.7555	1.31163	.23947	32.2657	33.2453	30.81	34.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
พีเอช	Between Groups	.213	9	.024	49.887	.000
	Within Groups	.009	20	.000		
	Total	.222	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
72	3	4.4267			
144	3	4.4367	4.4367		
168	3	4.4533	4.4533		
96	3	4.4567	4.4567		
48	3		4.4733		
120	3			4.5667	
0	3				4.6100
36	3				4.6100
12	3				4.6300
24 hr.	3				4.6433
Sig.		.136	.071	1.000	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	4.6100	.01732	.01000	4.5670	4.6530	4.60	4.63
12	3	4.6300	.01000	.00577	4.6052	4.6548	4.62	4.64
24	3	4.6433	.02517	.01453	4.5808	4.7058	4.62	4.67
36	3	4.6100	.01732	.01000	4.5670	4.6530	4.60	4.63
48	3	4.4733	.02082	.01202	4.4216	4.5250	4.45	4.49
72	3	4.4267	.01528	.00882	4.3887	4.4646	4.41	4.44
96	3	4.4567	.04163	.02404	4.3532	4.5601	4.41	4.49
120	3	4.5667	.00577	.00333	4.5523	4.5810	4.56	4.57
144	3	4.4367	.01155	.00667	4.4080	4.4654	4.43	4.45
168	3	4.4533	.02887	.01667	4.3816	4.5250	4.42	4.47
Total	30	4.5307	.08749	.01597	4.4980	4.5633	4.41	4.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองและแหล่งไนโตรเจนเป็นโปรตีนที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OD 600 nm	Between Groups	.636	9	.071	477.764	.000
	Within Groups	.003	20	.000		
	Total	.639	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	3	.1340								
12	3		.2670							
24	3			.3647						
36	3				.3867					
48	3					.4227				
72	3					.4407				
168	3						.4710			
144	3							.5223		
96	3								.5587	
120	3									.6847
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.085	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.										
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.										

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.1340	.03351	.01935	.0508	.2172	.10	.17
12	3	.2670	.00557	.00321	.2532	.2808	.26	.27
24	3	.3647	.00306	.00176	.3571	.3723	.36	.37
36	3	.3867	.00764	.00441	.3677	.4056	.38	.40
48	3	.4227	.00551	.00318	.4090	.4363	.42	.43
72	3	.4407	.00862	.00498	.4192	.4621	.43	.45
96	3	.5587	.00058	.00033	.5572	.5601	.56	.56
120	3	.6847	.00987	.00570	.6602	.7092	.68	.70
144	3	.5223	.00153	.00088	.5185	.5261	.52	.52
168	3	.4710	.00721	.00416	.4531	.4889	.46	.48
Total	30	.4252	.14840	.02709	.3698	.4806	.10	.70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง	Between Groups	.471	9	.052	9.964	.000
	Within Groups	.105	20	.005		
	Total	.576	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.120000				
36	3	.202200	.202200			
12	3	.226700	.226700	.226700		
48	3	.228900	.228900	.228900		
168	3	.240000	.240000	.240000		
24	3		.288900	.288900		
72	3			.357767	.357767	
144	3				.440033	.440033
120	3				.468900	.468900
96	3					.524467
Sig.		.082	.202	.059	.090	.192

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.120000	.0569464	.0328780	-.021463	.261463	.0600	.1733
12	3	.226700	.0200000	.0115470	.177017	.276383	.2067	.2467
24	3	.288900	.0329017	.0189958	.207168	.370632	.2667	.3267
36	3	.202200	.0472824	.0272985	.084744	.319656	.1600	.2533
48	3	.228900	.0542819	.0313396	.094056	.363744	.1667	.2667
72	3	.357767	.0601246	.0347129	.208409	.507124	.3000	.4200
96	3	.524467	.1166660	.0673572	.234652	.814281	.4067	.6400
120	3	.468900	.0767237	.0442964	.278308	.659492	.3933	.5467
144	3	.440033	.1205543	.0696020	.140560	.739507	.3267	.5667
168	3	.240000	.0705471	.0407304	.064751	.415249	.1867	.3200
Total	30	.309787	.1409466	.0257332	.257156	.362417	.0600	.6400

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำตาลรีดิวซ์	Between Groups	1688.627	9	187.625	668.280	.000
	Within Groups	5.615	20	.281		
	Total	1694.242	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
36	3	51.1323								
72	3		53.7138							
120	3			57.9710						
96	3				59.3297					
24	3					60.5525				
144	3						66.7119			
168	3						67.3460			
0	3							69.6105		
12	3								72.8261	
48	3									73.9130
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.158	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	69.6105	1.08978	.62918	66.9034	72.3177	68.48	70.65
12	3	72.8261	.13590	.07846	72.4885	73.1637	72.69	72.96
24	3	60.5525	.54913	.31704	59.1884	61.9166	60.05	61.14
36	3	51.1323	.07840	.04527	50.9375	51.3270	51.09	51.22
48	3	73.9130	.27175	.15689	73.2380	74.5881	73.64	74.18
72	3	53.7138	.54913	.31704	52.3497	55.0779	53.13	54.21
96	3	59.3297	.03920	.02263	59.2323	59.4271	59.31	59.38
120	3	57.9710	.34191	.19740	57.1217	58.8203	57.61	58.29
144	3	66.7119	.75651	.43677	64.8327	68.5912	65.90	67.39
168	3	67.3460	.47717	.27549	66.1607	68.5313	66.85	67.80
Total	30	63.3107	7.64344	1.39549	60.4566	66.1648	51.09	74.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือแสวงหาผลประโยชน์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
โปรตีนที่ละลายน้ำ	Between Groups	52.213	9	5.801	38.323	.000
	Within Groups	3.028	20	.151		
	Total	55.241	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
24	3	23.5730					
36	3	23.6650	23.6650				
72	3	23.7263	23.7263				
48	3	24.0022	24.0022	24.0022			
12	3		24.3394	24.3394	24.3394		
120	3			24.4620	24.4620		
0	3				24.9219		
168	3					26.3932	
144	3					26.8531	26.8531
96	3						27.2209
Sig.		.230	.064	.186	.097	.163	.261

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	24.9219	.60303	.34816	23.4239	26.4199	24.37	25.57
12	3	24.3394	.34816	.20101	23.4745	25.2043	24.09	24.74
24	3	23.5730	.34819	.20103	22.7081	24.4380	23.17	23.82
36	3	23.6650	.34816	.20101	22.8001	24.5299	23.27	23.91
48	3	24.0022	.18390	.10617	23.5454	24.4590	23.82	24.19
72	3	23.7263	.15929	.09197	23.3306	24.1220	23.54	23.82
96	3	27.2209	.48661	.28094	26.0121	28.4297	26.67	27.59
120	3	24.4620	.24331	.14048	23.8576	25.0664	24.19	24.65
144	3	26.8531	.15929	.09197	26.4574	27.2488	26.76	27.04
168	3	26.3932	.63716	.36787	24.8104	27.9760	25.66	26.76
Total	30	24.9157	1.38017	.25198	24.4003	25.4311	23.17	27.59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือ ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
พีเอช	Between Groups	.145	9	.016	62.685	.000
	Within Groups	.005	20	.000		
	Total	.150	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
168	3	4.2833			
144	3	4.2833			
48	3		4.4100		
120	3		4.4167		
0	3		4.4367	4.4367	
72	3			4.4500	4.4500
36	3			4.4600	4.4600
24	3				4.4700
96	3				4.4700
12	3				4.4767
Sig.		1.000	.067	.106	.080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	4.4367	.00577	.00333	4.4223	4.4510	4.43	4.44
12	3	4.4767	.00577	.00333	4.4623	4.4910	4.47	4.48
24	3	4.4700	.01000	.00577	4.4452	4.4948	4.46	4.48
36	3	4.4600	.01000	.00577	4.4352	4.4848	4.45	4.47
48	3	4.4100	.02000	.01155	4.3603	4.4597	4.39	4.43
72	3	4.4500	.04000	.02309	4.3506	4.5494	4.41	4.49
96	3	4.4700	.01000	.00577	4.4452	4.4948	4.46	4.48
120	3	4.4167	.00577	.00333	4.4023	4.4310	4.41	4.42
144	3	4.2833	.00577	.00333	4.2690	4.2977	4.28	4.29
168	3	4.2833	.01155	.00667	4.2546	4.3120	4.27	4.29
Total	30	4.4157	.07190	.01313	4.3888	4.4425	4.27	4.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
OD 600 nm	Between Groups	.800	9	.089	1099.406	.000
	Within Groups	.002	20	.000		
	Total	.802	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	.1157						
12	3		.2137					
24	3			.4370				
168	3				.4620			
144	3					.5360		
36	3					.5440		
48	3						.5850	
72	3						.5903	
96	3						.5923	
120	3							.6177
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.289	.357	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.								
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.								

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.1157	.01662	.00960	.0744	.1570	.10	.13
12	3	.2137	.00473	.00273	.2019	.2254	.21	.22
24	3	.4370	.00100	.00058	.4345	.4395	.44	.44
36	3	.5440	.00200	.00115	.5390	.5490	.54	.55
48	3	.5850	.00100	.00058	.5825	.5875	.58	.59
72	3	.5903	.00577	.00333	.5760	.6047	.59	.60
96	3	.5923	.00577	.00333	.5780	.6067	.59	.60
120	3	.6177	.00115	.00067	.6148	.6205	.62	.62
144	3	.5360	.02078	.01200	.4844	.5876	.52	.56
168	3	.4620	.00200	.00115	.4570	.4670	.46	.46
Total	30	.4694	.16627	.03036	.4073	.5315	.10	.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเชลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่ว ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเชลล์แห้ง	Between Groups	.429	9	.048	9.227	.000
	Within Groups	.103	20	.005		
	Total	.533	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.115533			
24	3	.180000			
168	3	.199967			
48	3	.242200	.242200		
96	3		.328900	.328900	
120	3		.342233	.342233	
72	3			.377767	.377767
12	3			.404433	.404433
144	3				.477767
36	3				.480000
Sig.		.060	.122	.252	.125

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.115533	.1077913	.0622333	-.152235	.383302	.0533	.2400
12	3	.404433	.0795171	.0459092	.206902	.601965	.3400	.4933
24	3	.180000	.0352830	.0203706	.092352	.267648	.1533	.2200
36	3	.480000	.0067000	.0038682	.463356	.496644	.4733	.4867
48	3	.242200	.0500563	.0289000	.117853	.366547	.2133	.3000
72	3	.377767	.0390878	.0225673	.280667	.474866	.3333	.4067
96	3	.328900	.0101799	.0058774	.303612	.354188	.3200	.3400
120	3	.342233	.0509102	.0293930	.215765	.468701	.2867	.3867
144	3	.477767	.0401866	.0232017	.377938	.577596	.4400	.5200
168	3	.199967	.1553491	.0896908	-.185942	.585875	.0733	.3733
Total	30	.314880	.1355478	.0247475	.264266	.365494	.0533	.5200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำตาลรีดิวซ์	Between Groups	592.012	9	65.779	89.773	.000
	Within Groups	14.654	20	.733		
	Total	606.666	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
36	3	47.1920					
24	3	47.4638					
168	3		49.8641				
12	3			51.4040			
0	3			52.4910	52.4910		
96	3				53.2156		
72	3					55.9783	
120	3						59.0580
144	3						59.1486
48	3						59.2844
Sig.		.702	1.000	.136	.312	1.000	.763

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	52.4910	.20754	.11982	51.9754	53.0065	52.31	52.72
12	3	51.4040	1.09822	.63405	48.6758	54.1321	50.41	52.58
24	3	47.4638	1.13949	.65789	44.6331	50.2944	46.74	48.78
36	3	47.1920	.78445	.45290	45.2433	49.1407	46.74	48.10
48	3	59.2844	.51436	.29697	58.0067	60.5622	58.70	59.65
72	3	55.9783	.40760	.23533	54.9658	56.9908	55.57	56.39
96	3	53.2156	.37417	.21603	52.2861	54.1451	52.79	53.46
120	3	59.0580	.78445	.45290	57.1093	61.0067	58.15	59.51
144	3	59.1486	1.70963	.98706	54.9016	63.3955	57.34	60.73
168	3	49.8641	.23533	.13587	49.2795	50.4487	49.59	50.00
Total	30	53.5100	4.57379	.83506	51.8021	55.2178	46.74	60.73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
โปรตีนที่ละลายน้ำ	Between Groups	19.678	9	2.186	21.191	.000
	Within Groups	2.064	20	.103		
	Total	21.741	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
36	3	23.4811				
12	3	23.8183				
168	3		24.3701			
24	3		24.4007			
96	3		24.5846			
72	3		24.6766	24.6766		
48	3		24.6766	24.6766		
0	3			25.1977	25.1977	
144	3				25.6882	
120	3					26.3933
Sig.		.213	.306	.073	.076	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	25.1977	.09195	.05309	24.9693	25.4261	25.11	25.29
12	3	23.8183	.24330	.14047	23.2139	24.4226	23.54	24.00
24	3	24.4007	.10617	.06130	24.1369	24.6645	24.28	24.46
36	3	23.4811	.28097	.16222	22.7831	24.1790	23.17	23.73
48	3	24.6766	.38287	.22105	23.7255	25.6277	24.37	25.11
72	3	24.6766	.47190	.27245	23.5043	25.8489	24.28	25.20
96	3	24.5846	.55435	.32005	23.2076	25.9617	24.00	25.11
120	3	26.3933	.15929	.09197	25.9976	26.7890	26.30	26.58
144	3	25.6882	.37166	.21458	24.7649	26.6115	25.29	26.03
168	3	24.3701	.18395	.10620	23.9131	24.8270	24.19	24.55
Total	30	24.7287	.86585	.15808	24.4054	25.0520	23.17	26.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ทางสถิติของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	.022	9	.002	1.000	.471
	Within Groups	.048	20	.002		
	Total	.070	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	.000000
12	3	.000000
24	3	.000000
36	3	.000000
48	3	.000000
72	3	.000000
96	3	.000000
120	3	.000000
144	3	.000000
168	3	.089667
Sig.		.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
12	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
24	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
36	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
48	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
72	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
96	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
120	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
144	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
168	3	.089667	.1553072	.0896667	-.296138	.475471	.0000	.2690
Total	30	.008967	.0491125	.0089667	-.009372	.027306	.0000	.2690

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butanol	Between Groups	51.015	9	5.668	10.398	.000
	Within Groups	10.902	20	.545		
	Total	61.918	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	.301961			
0	3	.353184			
24	3	.522618			
36	3		1.790524		
120	3		2.558720	2.558720	
168	3		2.574484	2.574484	
48	3		2.789484	2.789484	
96	3		3.103859	3.103859	3.103859
144	3			3.224132	3.224132
72	3				4.332684
Sig.		.734	.063	.333	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.353184	.0418407	.0241567	.249246	.457122	.3101	.3937
12	3	.301961	.0360387	.0208070	.212436	.391486	.2641	.3358
24	3	.522618	.1415737	.0817376	.170930	.874307	.3596	.6151
36	3	1.790524	.4223614	.2438505	.741320	2.839728	1.3030	2.0442
48	3	2.789484	.6376099	.3681243	1.205573	4.373394	2.0766	3.3054
72	3	4.332684	.1183898	.0683524	4.038587	4.626781	4.1963	4.4091
96	3	3.103859	.8701487	.5023806	.942290	5.265428	2.1885	3.9204
120	3	2.558720	1.5430309	.8908693	-1.274382	6.391821	.8261	3.7849
144	3	3.224132	.8516771	.4917160	1.108449	5.339816	2.3278	4.0228
168	3	2.574484	.9827238	.5673759	.133262	5.015705	1.4523	3.2815
Total	30	2.155165	1.4611940	.2667763	1.609546	2.700784	.2641	4.4091

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ทางสถิติของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ethanol	Between Groups	.766	9	.085	10.529	.000
	Within Groups	.162	20	.008		
	Total	.928	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	.175901			
72	3		.342722		
96	3		.359308		
168	3		.372582		
48	3		.409466	.409466	
120	3		.438193	.438193	
36	3		.453463	.453463	
24	3		.497345	.497345	
144	3			.557303	
0	3				.823482
Sig.		1.000	.078	.084	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.823482	.0197862	.0114236	.774330	.872634	.8112	.8463
12	3	.175901	.2534757	.1463443	-.453768	.805570	.0294	.4686
24	3	.497345	.0289940	.0167397	.425320	.569370	.4641	.5176
36	3	.453463	.0074285	.0042888	.435010	.471917	.4451	.4592
48	3	.409466	.0911756	.0526403	.182973	.635959	.3053	.4748
72	3	.342722	.0037616	.0021717	.333378	.352067	.3396	.3469
96	3	.359308	.0562578	.0324804	.219556	.499060	.2995	.4111
120	3	.438193	.0418765	.0241774	.334166	.542220	.3900	.4658
144	3	.557303	.0237891	.0137347	.498208	.616399	.5298	.5711
168	3	.372582	.0388681	.0224405	.276028	.469135	.3289	.4032
Total	30	.442976	.1788785	.0326586	.376182	.509771	.0294	.8463

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetic acid	Between Groups	3.436	9	.382	10.686	.000
	Within Groups	.714	20	.036		
	Total	4.150	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
96	3	1.433468			
48	3	1.439807			
72	3	1.506166			
120	3	1.508570			
168	3	1.603698			
36	3	1.636323	1.636323		
144	3	1.750722	1.750722		
24	3		1.954176	1.954176	
12	3			2.207426	2.207426
0	3				2.488886
Sig.		.085	.064	.116	.083
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.					

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	2.488886	.0512479	.0295880	2.361579	2.616193	2.4328	2.5334
12	3	2.207426	.1506190	.0869599	1.833268	2.581585	2.0352	2.3143
24	3	1.954176	.1608023	.0928392	1.554721	2.353631	1.7887	2.1098
36	3	1.636323	.1172519	.0676954	1.345053	1.927593	1.5603	1.7714
48	3	1.439807	.1868544	.1078804	.975635	1.903979	1.2417	1.6129
72	3	1.506166	.0244475	.0141148	1.445435	1.566897	1.4780	1.5214
96	3	1.433468	.3115426	.1798692	.659553	2.207383	1.1274	1.7502
120	3	1.508570	.1223795	.0706558	1.204562	1.812577	1.3980	1.6401
144	3	1.750722	.2920804	.1686327	1.025155	2.476290	1.4683	2.0516
168	3	1.603698	.2438623	.1407939	.997911	2.209485	1.3791	1.8631
Total	30	1.752924	.3783048	.0690687	1.611663	1.894186	1.1274	2.5334

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทิริกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butyric acid	Between Groups	15.599	9	1.733	16.069	.000
	Within Groups	2.157	20	.108		
	Total	17.756	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
12	3	.143262		
0	3	.476426		
24	3		1.157370	
168	3			1.735773
96	3			2.012624
120	3			2.030444
48	3			2.090097
72	3			2.098774
144	3			2.143352
36	3			2.281047
Sig.		.228	1.000	.088

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.476426	.0176807	.0102080	.432505	.520347	.4564	.4900
12	3	.143262	.1693803	.0977917	-.277502	.564026	.0443	.3388
24	3	1.157370	.0832522	.0480657	.950560	1.364180	1.0692	1.2346
36	3	2.281047	.1802465	.1040653	1.833290	2.728804	2.1172	2.4741
48	3	2.090097	.5109519	.2949982	.820822	3.359372	1.5950	2.6156
72	3	2.098774	.2966008	.1712426	1.361977	2.835571	1.7565	2.2801
96	3	2.012624	.5080530	.2933246	.750550	3.274698	1.5161	2.5315
120	3	2.030444	.1493199	.0862099	1.659513	2.401375	1.8590	2.1318
144	3	2.143352	.3964292	.2288785	1.158568	3.128137	1.7553	2.5477
168	3	1.735773	.4728377	.2729930	.561179	2.910367	1.2583	2.2038
Total	30	1.616917	.7824789	.1428604	1.324734	1.909099	.0443	2.6156

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ทางสถิติของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	328.211	9	36.468	1.914	.109
	Within Groups	381.041	20	19.052		
	Total	709.252	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	.000000	
12	3	.000000	
36	3	.000000	
72	3	.000000	
144	3	.000000	
168	3	.000000	
24	3	1.685333	1.685333
48	3	5.301667	5.301667
120	3	7.418000	7.418000
96	3		8.787333
Sig.		.086	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
12	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
24	3	1.685333	1.4676435	.8473443	-1.960495	5.331162	.0000	2.6820
36	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
48	3	5.301667	9.1827560	5.3016667	-17.509564	28.112897	.0000	15.9050
72	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
96	3	8.787333	7.7094537	4.4510552	-10.364011	27.938678	.0000	14.4150
120	3	7.418000	6.6789200	3.8560762	-9.173357	24.009357	.0000	12.9540
144	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
168	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
Total	30	2.319233	4.9453980	.9029020	.472591	4.165875	.0000	15.9050

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butanol	Between Groups	1.918	9	.213	.441	.896
	Within Groups	9.659	20	.483		
	Total	11.578	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	.332053
36	3	.337355
24	3	.346802
168	3	.367054
12	3	.390247
120	3	.414514
144	3	.565895
48	3	.663189
96	3	.961548
72	3	1.046252
Sig.		.286

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.332053	.1032115	.0595892	.075662	.588445	.2218	.4264
12	3	.390247	.2002226	.1155985	-.107133	.887627	.1616	.5345
24	3	.346802	.2224162	.1284121	-.205710	.899315	.1024	.5373
36	3	.337355	.1890699	.1091596	-.132320	.807031	.1254	.4886
48	3	.663189	1.1486762	.6631885	-2.190281	3.516658	.0000	1.9896
72	3	1.046252	1.2987513	.7498344	-2.180025	4.272529	.0000	2.4998
96	3	.961548	.8447124	.4876949	-1.136834	3.059930	.1524	1.8378
120	3	.414514	.4725406	.2728214	-.759342	1.588370	.0000	.9291
144	3	.565895	.7712512	.4452821	-1.349999	2.481789	.0000	1.4444
168	3	.367054	.3947596	.2279146	-.613584	1.347691	.0568	.8114
Total	30	.542491	.6318504	.1153596	.306554	.778428	.0000	2.4998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ทางสถิติของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ethanol	Between Groups	582.828	9	64.759	2.340	.054
	Within Groups	553.466	20	27.673		
	Total	1136.293	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	4.642167	
36	3	6.438091	
24	3	6.657345	
12	3	6.712447	
144	3	9.119163	
120	3	9.428139	
96	3	10.182391	
48	3	10.256391	
168	3	14.200051	14.200051
72	3		20.600450
Sig.		.067	.152
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.			

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	4.642167	1.1493201	.6635603	1.787097	7.497236	3.3236	5.4320
12	3	6.712447	.4635322	.2676205	5.560969	7.863925	6.1811	7.0339
24	3	6.657345	.9752991	.5630892	4.234568	9.080123	5.6007	7.5231
36	3	6.438091	.6430239	.3712500	4.840731	8.035451	5.7186	6.9565
48	3	10.256391	1.9847803	1.1459135	5.325924	15.186859	8.0027	11.7437
72	3	20.600450	12.7148357	7.3409138	-10.984953	52.185853	11.2963	35.0883
96	3	10.182391	2.1115499	1.2191039	4.937011	15.427772	7.7443	11.4229
120	3	9.428139	4.1994327	2.4245436	-1.003830	19.860108	4.8752	13.1497
144	3	9.119163	3.0257772	1.7469333	1.602716	16.635610	5.8374	11.7983
168	3	14.200051	8.7736375	5.0654620	-7.594873	35.994974	7.7352	24.1876
Total	30	9.823664	6.2595944	1.1428404	7.486293	12.161034	3.3236	35.0883

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.27 การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetic acid	Between Groups	1243.053	9	138.117	7.420	.000
	Within Groups	372.285	20	18.614		
	Total	1615.338	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
48	3	.000000			
0	3		7.808443		
12	3		8.956840		
144	3		12.162990	12.162990	
24	3		13.774577	13.774577	
36	3		13.884286	13.884286	
120	3			17.770208	17.770208
168	3			18.535669	18.535669
96	3			18.840844	18.840844
72	3				23.745085
Sig.		1.000	.136	.107	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	7.808443	1.9635590	1.1336613	2.930692	12.686194	5.5635	9.2059
12	3	8.956840	3.6652553	2.1161361	-.148159	18.061839	6.4433	13.1625
24	3	13.774577	2.2280662	1.2863746	8.239754	19.309400	11.3700	15.7692
36	3	13.884286	1.3845042	.7993439	10.444987	17.323585	12.3701	15.0855
48	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
72	3	23.745085	2.7565114	1.5914726	16.897531	30.592639	20.8317	26.3120
96	3	18.840844	3.4336728	1.9824319	10.311128	27.370561	14.8835	21.0314
120	3	17.770208	3.9094903	2.2571453	8.058496	27.481920	13.8103	21.6272
144	3	12.162990	10.6800692	6.1661408	-14.367773	38.693753	.0000	20.0080
168	3	18.535669	3.6380346	2.1004203	9.498290	27.573048	14.4118	21.2907
Total	30	13.547894	7.4633303	1.3626115	10.761041	16.334748	.0000	26.3120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทิริกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butyric acid	Between Groups	217.886	9	24.210	1.689	.157
	Within Groups	286.675	20	14.334		
	Total	504.560	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
120	3	.000000	
24	3	.449406	
0	3	1.237473	
36	3	1.546975	1.546975
96	3	1.681547	1.681547
12	3	2.418000	2.418000
168	3	3.561330	3.561330
144	3	4.762039	4.762039
48	3	6.620349	6.620349
72	3		8.780417
Sig.		.077	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	1.237473	.5412731	.3125042	-.107124	2.582070	.6183	1.6210
12	3	2.418000	.2035297	.1175079	1.912404	2.923596	2.1836	2.5503
24	3	.449406	.7783935	.4494057	-1.484231	2.383042	.0000	1.3482
36	3	1.546975	.1400207	.0808410	1.199145	1.894806	1.3887	1.6549
48	3	6.620349	6.0032964	3.4660048	-8.292666	21.533364	.0000	11.7104
72	3	8.780417	8.7138260	5.0309298	-12.865927	30.426761	.0000	17.4261
96	3	1.681547	2.9125256	1.6815474	-5.553567	8.916662	.0000	5.0446
120	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
144	3	4.762039	3.4555345	1.9950538	-3.821985	13.346063	1.1643	8.0552
168	3	3.561330	3.1596750	1.8242392	-4.287738	11.410397	.0000	6.0285
Total	30	3.105754	4.1711663	.7615473	1.548215	4.663293	.0000	17.4261

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.29 การวิเคราะห์ทางสถิติของอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetone	Between Groups	746.304	9	82.923	1.677	.161
	Within Groups	989.166	20	49.458		
	Total	1735.470	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	.000000
72	3	.000000
144	3	.000000
36	3	4.203000
24	3	4.550333
12	3	4.739667
168	3	5.343667
120	3	12.629667
48	3	12.685667
96	3	12.761667
Sig.		.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
12	3	4.739667	4.1056915	2.3704221	-5.459436	14.938770	.0000	7.2010
24	3	4.550333	7.8814085	4.5503333	-15.028171	24.128837	.0000	13.6510
36	3	4.203000	7.2798095	4.2030000	-13.881049	22.287049	.0000	12.6090
48	3	12.685667	5.0115125	2.8933981	.236380	25.134954	6.9970	16.4490
72	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
96	3	12.761667	11.0753881	6.3943783	-14.751123	40.274456	.0000	19.8630
120	3	12.629667	11.3653065	6.5617628	-15.603320	40.862653	.0000	22.0330
144	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
168	3	5.343667	9.2555022	5.3436667	-17.648275	28.335609	.0000	16.0310
Total	30	5.691367	7.7358778	1.4123716	2.802742	8.579991	.0000	22.0330

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.30 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butanol	Between Groups	5.697	9	.633	.849	.582
	Within Groups	14.910	20	.746		
	Total	20.607	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
168	3	.056758
144	3	.062203
72	3	.144301
0	3	.197031
12	3	.201952
36	3	.584595
24	3	.615121
96	3	.735362
120	3	.813225
48	3	1.515093
Sig.		.089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	.197031	.2412920	.1393100	-.402372	.796434	.0000	.4662
12	3	.201952	.1434934	.0828460	-.154506	.558409	.0925	.3644
24	3	.615121	1.0654200	.6151205	-2.031529	3.261771	.0000	1.8454
36	3	.584595	.9667678	.5581637	-1.816990	2.986179	.0000	1.7005
48	3	1.515093	1.2860450	.7424984	-1.679620	4.709806	.0739	2.5459
72	3	.144301	.1584698	.0914926	-.249360	.537962	.0000	.3139
96	3	.735362	1.2736838	.7353617	-2.428644	3.899368	.0000	2.2061
120	3	.813225	1.4085468	.8132249	-2.685799	4.312249	.0000	2.4397
144	3	.062203	.1077381	.0622026	-.205434	.329839	.0000	.1866
168	3	.056758	.0983082	.0567583	-.187453	.300969	.0000	.1703
Total	30	.492564	.8429716	.1539049	.177793	.807335	.0000	2.5459

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.31 การวิเคราะห์ทางสถิติของเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ethanol	Between Groups	1004.927	9	111.659	1.954	.102
	Within Groups	1142.997	20	57.150		
	Total	2147.925	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
12	3	2.387703	
0	3	4.586096	
72	3	6.148003	6.148003
144	3	8.138822	8.138822
36	3	8.445696	8.445696
24	3	8.584751	8.584751
48	3	10.484601	10.484601
168	3	14.844196	14.844196
96	3		19.370227
120	3		20.717756
Sig.		.093	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	4.586096	1.1893794	.6866885	1.631513	7.540678	3.2379	5.4871
12	3	2.387703	4.1356221	2.3877025	-7.885752	12.661157	.0000	7.1631
24	3	8.584751	2.4164128	1.3951166	2.582049	14.587453	5.8730	10.5096
36	3	8.445696	2.0097247	1.1603151	3.453264	13.438129	6.2333	10.1584
48	3	10.484601	2.2503358	1.2992320	4.894457	16.074745	7.9525	12.2559
72	3	6.148003	1.5527846	.8965006	2.290672	10.005334	4.5660	7.6698
96	3	19.370227	11.4755523	6.6254132	-9.136625	47.877080	12.2656	32.6092
120	3	20.717756	14.5295948	8.3886655	-15.375759	56.811270	10.2414	37.3047
144	3	8.138822	2.7668469	1.5974398	1.265593	15.012051	5.4912	11.0112
168	3	14.844196	13.6078885	7.8565181	-18.959674	48.648065	3.4139	29.8967
Total	30	10.370785	8.6061821	1.5712667	7.157184	13.584386	.0000	37.3047

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.32 การวิเคราะห์ทางสถิติของกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Acetic acid	Between Groups	1786.535	9	198.504	56.034	.000
	Within Groups	70.851	20	3.543		
	Total	1857.386	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
24	3	.000000	
36	3	.000000	
96	3	.000000	
120	3	.000000	
144	3	.000000	
168	3	.000000	
72	3	2.052650	
0	3	3.287031	
12	3		19.686451
48	3		19.859811
Sig.		.076	.911

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	3.287031	3.0620486	1.7678746	-4.319519	10.893581	.0000	6.0587
12	3	19.686451	.3646621	.2105378	18.780580	20.592321	19.3027	20.0284
24	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
36	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
48	3	19.859811	3.6436520	2.1036634	10.808477	28.911144	15.8092	22.8702
72	3	2.052650	3.5552946	2.0526503	-6.779191	10.884492	.0000	6.1580
96	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
120	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
144	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
168	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
Total	30	4.488594	8.0029857	1.4611386	1.500230	7.476958	.0000	22.8702

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.33 การวิเคราะห์ทางสถิติของบิวทิริกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Butyric acid	Between Groups	49.733	9	5.526	2.034	.089
	Within Groups	54.331	20	2.717		
	Total	104.064	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
48	3	.000000	
96	3	.000000	
120	3	.000000	
168	3	.000000	
0	3	1.384553	1.384553
72	3	2.258847	2.258847
36	3	2.325874	2.325874
24	3	2.410121	2.410121
12	3	2.849963	2.849963
144	3		3.415265
Sig.		.081	.195

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมงที่	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0	3	1.384553	.4089967	.2361343	.368549	2.400557	.9161	1.6704
12	3	2.849963	.1407093	.0812385	2.500421	3.199504	2.7333	3.0062
24	3	2.410121	3.0370259	1.7534277	-5.134269	9.954512	.0000	5.8213
36	3	2.325874	2.8187519	1.6274072	-4.676294	9.328042	.0000	5.4606
48	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
72	3	2.258847	.5465899	.3155738	.901042	3.616651	1.7639	2.8455
96	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
120	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
144	3	3.415265	3.0839536	1.7805214	-4.245700	11.076230	.0000	5.9962
168	3	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000	.0000	.0000
Total	30	1.464462	1.8943083	.3458518	.757116	2.171809	.0000	5.9962

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ การใช้ ดัดแปลง คัดลอก หรือนำไปเผยแพร่ต่อ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปภาพประกอบการทดลองและวิจัย

รูปที่ค. 1 ตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ผ่านการบด

รูปที่ ค.2 ตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกและเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

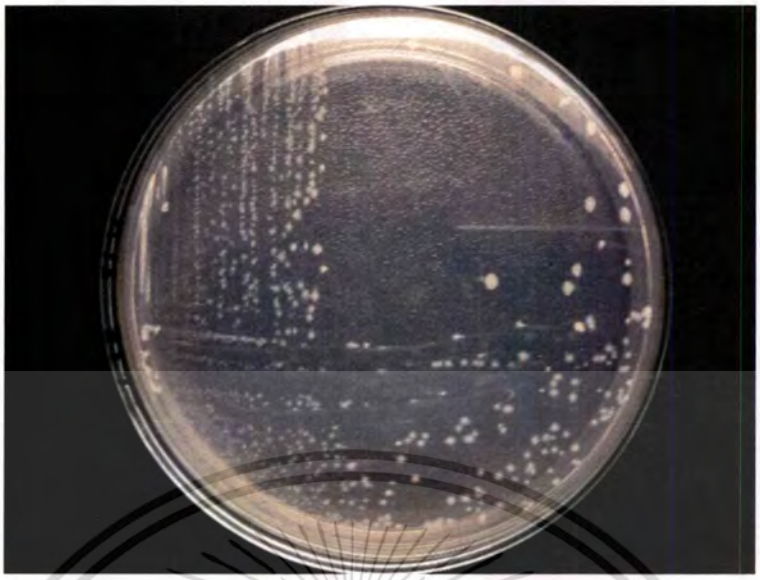
รูปที่ ค.3 ส่วนใสที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง

(ซ้าย) คือ ตัวอย่างที่นำไประเหยตัวน้ำออกเพื่อให้ได้ความเข้มข้นน้ำตาลที่สามารถนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp.

(ขวา) คือ ตัวอย่างส่วนใสที่ผ่านการระเหยน้ำออกและนำไปกรองเอาตะกอนออก

รูปที่ ค.4 เชื้อ *Clostridium* G10 ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.5 เชื้อ *Clostridium* G10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร T6

รูปที่ ค.6 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Clostridium* G10 คือ
(ซ้าย) อาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส มีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร
(กลาง) อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง มีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร
(ขวา) อาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง มีความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้