การปรับสภาพและการย่อยสลายยูคาลิปตัสเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

PRETREATMAENT AND HYDROLYSIS OF EUCALYPTUS FOR ACETONE BUTANOL ETHANOL PRODUCTION

ตุลยา รินทนาพิพัฒน์

ธาริณี วงศ์อยู่

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRETREATMAENT AND HYDROLYSIS OF EUCALYPTUS FOR ACETONE BUTANOL ETHANOL PRODUCTION

TUNLAYA RINTHANAPIPAT
TARINEE WONGYOU

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHLOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การปรับสภาพและการย่อยสลายยูคาลิปตัสเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล
ชื่อนักศึกษา	นางสาวตุลยา รินทนาพิพัฒน์ รหัสนักศึกษา 57050688
	นางสาวธาริณี วงศ์อยู่ รหัสนักศึกษา 57050704
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

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

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การปรับสภาพและการย่อยสลายยูคาลิปตัสเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล
ชื่อนักศึกษา	นางสาวตุลยา รินทนาพิพัฒน์ รหัสนักศึกษา 57050688 นางสาวธาริณี วงศ์อยู่ รหัสนักศึกษา 57050704
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาการปรับสภาพยูคาลิปตัสและย่อยยูคาลิปตัสให้เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ โดยนำกิ่งยูคาลิปตัสมาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 11.91 กรัมต่อลิตร หลังจากการปรับสภาพด้วยสารละลายด่างและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อใช้เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 อัตราส่วน 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ผลความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 15.53 กรัมต่อลิตร นำสารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. G10 จากการทดลองพบว่า ปริมาณอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอล สูงที่สุดในอาหาร T6 คือ 0.06 ± 0.00 กรัมต่อลิตร, 1.58 ± 0.08 กรัมต่อลิตร และ 1.06 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหาร T6 ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นบิวทานอล เท่ากับ 0.44 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และเอทานอล เท่ากับ 0.77 ± 0.14 กรัมต่อลิตร และอาหารที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยให้ระดับความเข้มข้นบิวทานอล 0.36 ± 0.17 กรัมต่อลิตร และเอทานอล เท่ากับ 0.37 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่พบการผลิตอะซิโตนในการทดลองนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอล ในอาหารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Clostridium* sp. สามารถผลิตอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพ

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่ว่าจะเป็นส่วนใดส่วนหนึ่งหรือทั้งหมดของเอกสาร ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือกระทำการใดๆ ในลักษณะเดียวกันนี้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และย่อยยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เพียงแต่ต้องการกระบวนการย่อยที่เหมาะสมให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น และการกำจัดตัวยับยั้งการหมักจากสารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

คำสำคัญ : การปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์, *Clostridium* sp., กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล, ยูคาลิปตัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Pretreatment and Hydrolysis of Eucalyptus for Acetone Butanol Ethanol Production
Students	Miss Tunlaya Rinthanapipat Student ID 57050688
	Miss Tarinee Wongyou Student ID 57050704
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

The aims of this study were investigate the optimization of pretreatment and hydrolysis of eucalyptus for the cultivation of *Clostridium* sp. G10 isolated in laboratory. The optimum conditions for eucalyptus pretreatment was 0.6 M NaOH alkali solution at 121 °C 15 psi for 20 minutes. The concentration of reducing sugar of 11.91 g/L has been obtained after these alkali pretreatment and cellulose hydrolysis. Using ACCELLERASE® 1500 in the ratio 0.8 ml g of eucalyptus for 24 h resulted in the reducing sugar concentration of 15.53 g/L. Eucalyptus hydrolysate was then utilized as a carbon source for the cultivation of *Clostridium* sp. G10. It has been found that the maximum concentrations of acetone, butanol and ethanol in T6 medium were 0.06 ± 0.00 g/L, 1.58 ± 0.08 g/L and 1.06 ± 0.03 g/L, respectively with 50 g/L glucose. The T6 medium with eucalyptus hydrolysate (50 g/L reducing sugar equivalent) provided 0.44 ± 0.18 g/L butanol and 0.77 ± 0.14 g/L ethanol. Using solely eucalyptus hydrolysate in microbial cultivation resulted in butanol concentration of 0.36 ± 0.17 g/L and ethanol concentration of 0.37 ± 0.06 g/L. Acetone have not been obtained in this experiment. The results showed that the concentrations of acetone, butanol and ethanol was significantly difference affected by the media. These

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

findings suggested that the production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium* sp. G10 could be utilized eucalyptus hydrolysate as a carbon source. Nevertheless, more studies of the eucalyptus hydrolysis conditions will be required for higher reducing sugar concentration and the fermentation inhibitor removal from the eucalyptus hydrolysates will also be expected to efficiently enhance acetone-butanol-ethanol fermentation.

Keyword : pretreatment and enzyme hydrolysis, *Clostridium* sp., Eucalyptus, acetone-butanol-ethanol fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา การช่วยเหลือให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ และกำลังใจจากหลาย ๆ ฝ่ายด้วยกัน คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็น ให้ความรู้และเสนอแนวทางในการศึกษาค้นคว้าด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่งตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้สำเร็จลุล่วง ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ผศ.ลินจง สุขลำภู และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล คณะกรรมการ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ให้คำปรึกษาแนะนำ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณบิดา - มารดาที่ให้ได้รับการศึกษาตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงพี่ น้อง และเพื่อน ๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ตลอดจนบุคคลอื่น ๆ ที่ให้ความช่วยเหลืออีกมากที่ไม่ได้กล่าวมา คณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและความปรารถนาดีของทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นางสาวตุลยา รินทนาพิพัฒน์

นางสาวธาริณี วงศ์อยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **4**

2.1 ลิกโนเซลลูโลส 4

2.1.1 เซลลูโลส 5

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส 5

2.1.3 ลิกนิน 7

2.2 บิวทานอล 8

2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล 8

2.2.2 ประโยชน์ของบิวทานอล 9

2.2.3 บิวทานอลในแง่ของการเป็นสารเชื้อเพลิง 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 ยูคาลิปตัส 11
2.3.1 อนุกรมวิธาน 11
2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้ยูคาลิปตัส 12
2.3.3 สวนประกอบทางเคมีในยูคาลิปตัส 14
2.4 การปรับสภาพ 15
2.4.1 การปรับสภาพทางกล 15
2.4.2 การปรับสภาพทางกายภาพ 15
2.4.3 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี 16
2.4.4 การปรับสภาพทางเคมี 17
2.4.5 การปรับสภาพทางชีวภาพ 18
2.5 การย่อย 18
2.5.1 การย่อยด้วยกรด 18
2.5.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ 19
2.6 *Clostridium* sp 20
2.6.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา 21
2.6.2 อนุกรมวิธาน 21
2.6.3 กระบวนการเมตาบอลิซึมที่ผลิตบิวทานอล 21
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 23
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย **28**
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์ 28
3.1.2 สารเคมี 28
3.1.3 อุปกรณ์ 28
3.1.4 ยูคาลิปตัส 30
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 30
3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridium Medium (HIMEDIA®) 30
3.2.2 อาหาร T6 30
3.3 การเตรียมกิ่งไม้ยูคาลิปตัส 31
3.4 การปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัส 31
3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น 31
3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด 31
3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส 31
3.5 กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ 32
3.6 การผลิตบิวทานอล 33
3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ 33
3.6.2 การหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล 33
3.7 การวิเคราะห์ 34
3.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ 34
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส 37
3.7.3 การวิเคราะห์ทางเคมี 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ 42

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล **43**

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบยูคาลิปตัส 43

4.2 การปรับสภาพยูคาลิปตัส 44

4.2.1 ผลของการปรับสภาพของยูคาลิปตัสด้วยกรดและเบส 44

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 49

4.4 การศึกษาชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ 51

4.5 การเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. G10 52

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ **68**

5.1 สรุปผลการวิจัย 68

5.2 ข้อเสนอแนะ 71

เอกสารอ้างอิง 72

ภาคผนวก 77

ภาคผนวก ก 78

ภาคผนวก ข 100

ภาคผนวก ค 162

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร 4

2.2 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล 9

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของยูคาลิปตัสพันธุ์ต่าง ๆ 14

4.1 องค์ประกอบยูคาลิปตัสที่ใช้ในการทดลอง 44

4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 0.0 - 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที 45

4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง 47

4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ 50

4.5 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส 51

4.6 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.7 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร 56

4.8 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นเซลล์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร 58

4.9 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร 61

4.10 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร 62

4.11 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร 63

4.12 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหารในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสซึ่งผ่านการย่อย โดยมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส 5

2.2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (a) ไซแลน (b) กาแลคโตกลูโคแมนแนน และ (c) อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน 6

2.3 โครงสร้างลิกนิน 7

2.4 สูตรโครงสร้างของ (a) trans-coniferyl alcohool (b) trans-p-sinapyl alcohol และ (c) tran-p- coumaryl alcohol 8

2.5 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล 8

2.6 ต้นยูคาลิปตัส 12

2.7 ใบยูคาลิปตัส 13

2.8 ดอกยูคาลิปตัส 13

2.9 ผลยูคาลิปตัส 14

2.10 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* 20

2.11 วิถีการสร้างอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของ *Clostridium acetobutylicum* ... 22

4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 0.0 - 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที 46

4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 48

4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 15000 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร 55

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร .. 57

4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร 59

4.7 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ใน (ก) อาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, (ข) อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส (ค) อาหารชุดทดลองที่เป็น ยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย ทั้งหมดมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร 64

4.8 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสซึ่งผ่านการย่อย โดยมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) หลายชนิดมาใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวภาพ (รัชพล, 2558) ซึ่งวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสมี เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของผนังเซลล์ ยูคาลิปตัสเป็นพืชที่รู้จักกันเป็นอย่างดี มีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย และเห็นได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (บุญวงศ์, 2549) เนื่องจากยูคาลิปตัสสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่อุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังเป็นไม้เอนกประสงค์ เช่น ใบใช้กลั่นน้ำมัน ดอกใช้เลี้ยงผึ้ง เนื้อไม้ใช้ทำฟืน เผาถ่าน และใช้ประโยชน์ทั่ว ๆ ไปได้เหมือนกับไม้อื่น ๆ แต่บทบาททางเศรษฐกิจที่โดดเด่นของไม้ชนิดนี้คือ การใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและอุตสาหกรรมแผ่นใยไม้อัด ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมจะใช้เพียงแต่ลำต้น จึงทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งหลังการเก็บเกี่ยว รวมไปถึงของเสียจากโรงงานแปรรูปทางการเกษตรเช่น กิ่ง ก้าน และใบ ทำให้ยูคาลิปตัสเป็นวัตถุดิบตั้งต้นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาใช้ในการกระบวนการผลิตพลังงานทดแทนในรูปแบบไบโอบิวทานอล (Biobutanol) ซึ่งเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประโยชน์สูงสุดและเป็นทางเลือกพลังงานทดแทนอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

เนื่องจากปัญหาสิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจ และวิกฤตด้านพลังงาน เชื้อเพลิงฟอสซิลที่มีการใช้หมดไปอย่างรวดเร็ว รวมถึงอัตราเงินเฟ้อและความผันผวนของราคาน้ำมันที่มีแนวโน้มจะปรับตัวสูงขึ้นทั่วโลก (Zheng และคณะ, 2015) กระตุ้นให้เกิดความสนใจในการหาแหล่งพลังงานใหม่หรือการผลิตเชื้อเพลิงจากแหล่งทดแทนอื่น เช่น วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านกระบวนการทางชีวภาพอย่างไบโอบิวทานอล (Biobutanol) ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทน และยังจัดเป็นพลังงานเชื้อเพลิงหมุนเวียนที่ดีกว่าไบโอเอทานอล (Bioethanol) เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงเหลวสามารถผสมเข้ากับน้ำมันเชื้อเพลิง (gasoline) ได้ในทุกสัดส่วน มีค่าพลังงานและจุดเดือดสูงกว่า การเผาไหม้มีความสมบูรณ์มากกว่า สามารถขนส่งตามท่อน้ำมัน และไม่มีปัญหากับเครื่องยนต์ เนื่องจากไม่มีการกัดกร่อนทำให้ไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ และสามารถนำมาใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย (ชนิกา ชมภูนุช และวรวุฒิ, 2555) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าไบโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บิวทานอลจะดีกว่าพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิลด้วยเหตุผลหลายประการ ข้อจำกัดที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE) ในเชิงเศรษฐกิจเกิดจากราคาของสารตั้งต้นที่มีราคาสูง (จันทรัสม์ และ ชมภูนุช, 2559) สารตั้งต้นบางชนิดแม้จะมีราคาต่ำแต่ก็มีสารที่เป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมักด้วย ทำให้ผลผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้ความเข้มข้นที่ต่ำ ดังนั้นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสอย่างยูคาลิปตัสที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษและคุณสมบัติที่ไม่สามารถรับประทานได้ จึงเป็นสารตั้งต้นที่น่าสนใจสำหรับกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้ *Clostridium* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ที่สร้างสปอร์และเจริญเติบโตในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีวิถีในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้

งานวิจัยนี้ได้เสนอแนวทางในการผลิตบิวทานอลโดยใช้สารตั้งต้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งจะมุ่งเน้นในการศึกษาการปรับสภาพยูคาลิปตัสให้เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ร่วมกับการหมักบิวทานอล เพื่อให้ได้บิวทานอลในปริมาณมาก โดยทั่วไปในกระบวนการผลิตบิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส จำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) และขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสทำให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยวัสดุได้ง่ายมากขึ้น จากนั้นจุลินทรีย์จะนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการหมักให้ได้บิวทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการปรับสภาพกิ่งของยูคาลิปตัสที่เหมาะสม ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
2. เพื่อย่อยสลายกิ่งของยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด
3. เพื่อนำยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพ และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่เหมาะสม มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยปรับสภาพด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 หลังจากนั้นนำมาผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการหมักโดยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้ประโยชน์จากกิ่งยูคาลิปตัสในการผลิตสารละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
2. ทราบถึงความเป็นไปได้ในการผลิตสารละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากเชื้อ *Clostridium* sp. G10 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากกิ่งยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลส (Bajpai, 2016) มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนและขรุขระ ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิดหลัก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน รวมทั้งเพคติน โปรตีน สารสกัด และเถ้าที่มีอยู่ปริมาณเล็กน้อย ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของพืช ไม้เนื้อแข็งจะมีปริมาณเซลลูโลสมากขึ้น ในทางตรงกันข้าม ฟางข้าวสาลีและใบจะมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมาก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 อัตราส่วนระหว่างส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในพืชชนิดเดียวจะแตกต่างกันไปตามอายุ ขั้นตอนการเจริญเติบโต และเงื่อนไขอื่น ๆ ความหลากหลายของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดเส้นทางการเปลี่ยนเป็นพลังงานที่เหมาะสมสำหรับมวลชีวภาพของลิกโนเซลลูโลสแต่ละชนิด ลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องได้รับการปรับสภาพเพื่อให้เป็นสารตั้งต้นที่ย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ที่ทำจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์หรือโดยเอนไซม์ที่ผลิตจุลินทรีย์เพื่อปลดปล่อยน้ำตาลที่ถูกนำมาใช้ในการหมัก

ตารางที่ 2.1 ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่พบในชีวมวลลิกโนเซลลูโลสที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

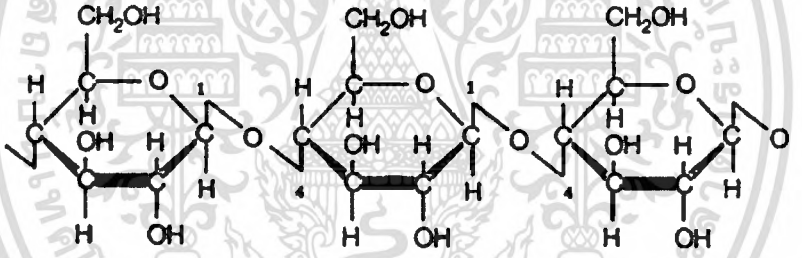
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	ร้อยละของเซลลูโลส	ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส	ร้อยละของลิกนิน
ไม้เนื้อแข็ง	40-55	24-40	18-25
ไม้เนื้ออ่อน	45-50	25-35	25-35
เปลือกถั่ว	25-30	25-30	30-40
ซังข้าวโพด	45	35	15
หญ้า	25-40	35-50	10-30
ฟางข้าว	30	50	15
ใบไม้	15-20	80-85	0
ใยเมล็ดฝ้าย	80-95	5-20	0
หญ้าสวิช	45	31.4	12.0

ที่มา : รัชพล (2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส (รัชพล, 2558; Bajpai, 2016) เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชที่สนับสนุนโครงสร้าง และยังมีอยู่ในแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่าย เป็นโฮโมพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือเบต้า-ดี-กลูโคไพราโนส (β-D-Glucopyranose) เชื่อมต่อด้วยพันธะเบต้า 1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic bond) เกิดเป็นพอลิเมอร์กลูแคน มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วยย่อย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous cellulose โดยส่วนของ crystalline cellulose จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ยากกว่า amorphous cellulose สำหรับโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส แสดงในรูปที่ 2.1 สายเซลลูโลสตั้งแต่ 20 - 300 โมเลกุลจัดเป็นกลุ่มเข้าด้วยกันเพื่อสร้างไมโครไฟเบอร์ ซึ่งรวมกลุ่มกันเพื่อสร้างเส้นใยเซลลูโลส พอลิเมอร์เซลลูโลสสายยาวถูกเชื่อมโยงกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแวนเดอร์วาล์ว



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

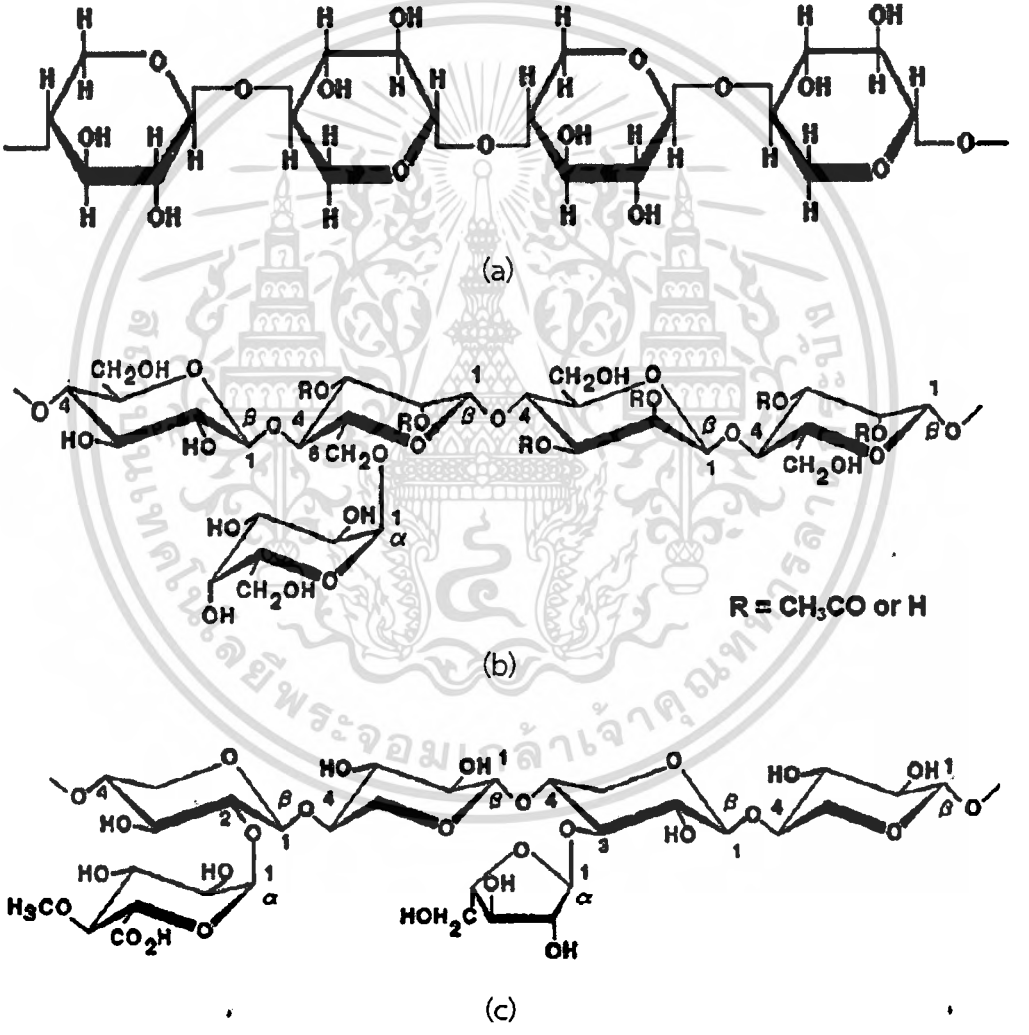
ที่มา : วนิดา และคณะ (2550)

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ที่มีมากที่สุดเป็นอันดับสองซึ่งมีประมาณ 20% - 50% ของสารชีวมวลลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮทเทอร์โรพอลิเมอร์ มีกิ่งก้านสั้นที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ หลายชนิดผสมกัน มีน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม คือ ไซโลส และอะราบิโนส น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม คือ กลูโคส แมนโนส และกาแลคโตส โครงสร้าหลักของเฮมิเซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ หรือเฮทเทอโรพอลิเมอร์ที่มีกิ่งสั้นที่เชื่อมกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก และบางครั้งจะมีพันธะเบต้า-1,3-ไกลโคซิดิก เฮมิเซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส และกิ่งสั้นด้านข้างสามารถย่อยสลายได้ง่าย ในชีวมวลทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกษตรเช่นฟางและหญ้า เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่ประกอบด้วยไซแลน ขณะที่ไม้เนื้ออ่อน เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคแมนแนนเป็นส่วนใหญ่ แสดงรูปที่ 2.2 ในส่วนสำคัญของลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนที่ไวต่ออุณหภูมิสูงที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส เช่น เฟอร์ฟูรัล และไฮดรอกซีเมทิล เฟอร์ฟูรัล ซึ่งรายงานว่ามีการยับยั้งกระบวนการหมัก ด้วยเหตุนี้ การปรับสภาพที่สภาวะรุนแรง มักจะช่วยเพิ่มการเก็บเกี่ยวน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้น ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการปรับสภาพซึ่งเฮมิเซลลูโลสอาจจะได้ส่วนที่เป็นของแข็งหรือการรวมกันของทั้งของแข็งและของเหลว



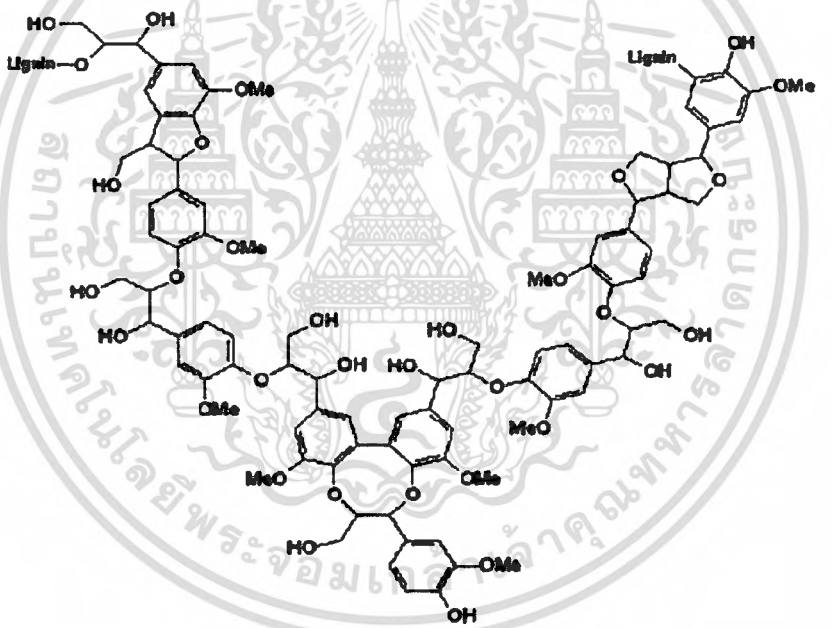
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (a) ไซแลน (b) กาแลคโตกลูโคแมนแนน และ (c) อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน

ที่มา : Bajpai (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ลิกนิน

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่อุดมสมบูรณ์เป็นอันดับสามในธรรมชาติ เป็นโครงสร้างโมเลกุลที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและมีพอลิเมอร์แบบ cross-linked ของฟีนอลิกโมเลกุลเดี่ยว แสดงในรูป 2.3 ซึ่งมีอยู่ในผนังเซลล์ของพืชและให้ความแข็งแรง ต้านทานต่อการทำลายของจุลินทรีย์และความเครียดจากออกซิเดชัน ลิกนินเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าเป็น 'กาว' ที่ยึดส่วนประกอบต่าง ๆ ของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสเข้าด้วยกันทำให้ไม่ละลายในน้ำ ลิกนินได้รับการระบุว่าเป็นอุปสรรคสำคัญของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ของสารชีวมวลลิกโนเซลลูโลสเนื่องจากความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเซลลูโลส ไมโครไฟเบอร์ Chang และ Holtzapple (2000) พบว่าการย่อยได้ของสารชีวมวลเพิ่มขึ้นเมื่อมีการกำจัดลิกนินเพิ่มขึ้น

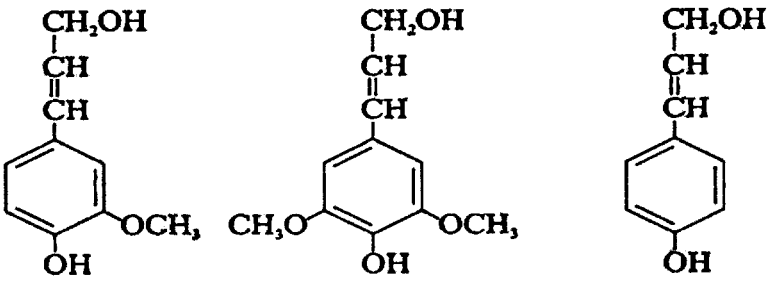


รูปที่ 2.3 โครงสร้างลิกนิน

ที่มา : Walker (2010)

. ฟีนิลโพรพิโอนิกแอลกอฮอล์ 3 แบบที่เป็นโมโนเมอร์ของลิกนิน คือ: Coniferyl alcohol (guaiacyl propanol) Coumaryl alcohol (p-hydroxyphenyl propanol) Sinapyl alcohol (syringyl alcohol) แสดงในรูป 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a) (b) (c)

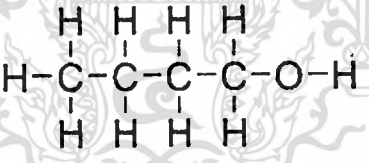
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ (a) trans-coniferyl alcohool (b) trans-p-sinapyl alcohol และ (c) tran-p- coumaryl alcohol

ที่มา : Eriksson และคณะ (1990)

2.2 บิวทานอล

2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

บิวทานอล (1-butanol) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อของ Butyl alcohol, n-butanol หรือ Methylolpropane เป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม (Primary alcohol) มีสูตรโมเลกุล C_4H_9OH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 74.12 กรัมต่อโมล และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล

ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/N-Butanol (สืบค้นเมื่อวันที่ 14 พฤศจิกายน 2560)

บิวทานอล (สุนทร และอภิชัย, 2555) เป็นสารที่ไม่มีสี ไวไฟ ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีกลิ่นเฉพาะตัวซึ่งคล้าย ๆ กลิ่นของกล้วย แต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม บิวทานอลสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะบริเวณดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอล ก่อให้เกิดการระเคืองต่อเยื่อบุโพรงจมูกได้ ทั้งนี้อาจก่อให้เกิดการเสพติดได้ เมื่อสูดดมที่ความเข้มข้นสูง ๆ บิวทานอลสามารถละลายเข้ากับตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี แต่ละลายในน้ำได้ค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์ เช่นเดียวกับบิวทานอลได้แก่ เมทานอล (1 คาร์บอน) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รวมถึงห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

บิวทานอลเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่น ๆ ที่สำคัญได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้บิวทานอลและสารอนุพันธ์สามารถใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีเยี่ยมในอุตสาหกรรมสีทา อุตสาหกรรมยานยนต์ และอุตสาหกรรมการขึ้นรูป รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย นอกจากนี้บิวทานอลยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมกลิ่นรสได้อีกด้วย

ตารางที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล

สมบัติ	บิวทานอล
จุดหลอมเหลว (Melting point, °C)	- 89.3
จุดเดือด (Boiling point, °C)	117.2
ความถ่วงจำเพาะ (Specific Gravity)	0.810 - 0.812
จุดติดไฟ (Ignition Temperature, °C)	35 - 37
ความหนาแน่น Density (g/cm^3)	0.809 - 0.812
ความหนาแน่นของไอ (Vapour Density)	2.6
จุดลุกติดไฟได้เอง (Auto-Ignition Temperature, °C)	343 - 345
จุดวาบไฟ (Flash point, °C)	25 - 29
ความหนาแน่นสัมพันธ์ (Relative density)	0.81
ความดันวิกฤต (Critical pressure, hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (critical temperature, °C)	287
ความดันไอ (Vapour Pressure, kPa)	7.3 mbar ที่ 20 °C
ความสามารถในการละลายน้ำ (Solubility in Water)	7.7 g/100 mL ที่ 20 °C

ที่มา : http://www.gctcl.com/sites/default/files/n-Butanol.pdf (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 บิวทานอลในแง่ของการเป็นสารเชื้อเพลิง

จุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่เหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการ เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงาน ทั้งนี้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงใด ๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก ซึ่งบิวทานอลมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธิ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้ ในทางตรงกันข้าม เอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้บางส่วนเท่านั้น เช่น ในประเทศบราซิลได้มีการใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนแค่ 23% นอกจากนี้ในแถบทวีปยุโรปบางประเทศ รวมทั้งประเทศสหรัฐอเมริกา จะใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนเพียง 10% เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใด ๆ ต่อเครื่องยนต์ รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย นอกจากนี้การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสม พบว่าไอเสียที่ออกมาปลอดจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ (สุนทร และอภิชัย, 2555)

คุณสมบัติอื่น ๆ ของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ได้แก่ บิวทานอลระเหยกลายเป็นไอได้ต่ำกว่า โดยมีค่า Reid Vapor Preessure (RVP) ต่ำกว่าเอทานอลถึง 7 เท่า และบิวทานอลยังมีความสามารถในการกัดกร่อนต่ำ จึงทำให้ปลอดภัยต่อการขนส่งลำเลียง ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลมีความดันไอต่ำ มีค่าออกเทนที่สูงจึงสามารถนำไปผสมเข้ากับแก๊สโซลีนและน้ำมันดีเซลได้อย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงที่มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งลำเลียงด้วยระบบท่อไปยังสถานีจ่ายได้ ในขณะที่เอทานอลไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้ เนื่องจากมีค่าความดันไอสูง นอกจากนี้บิวทานอลยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่สามารถผสมเข้ากับแก๊สโซลีนได้ดีกว่าเชื้อเพลิงชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีความหนืดเป็น 2 เท่าของเอทานอล และประมาณ 5 - 7 เท่าของแก๊สโซลีน (ชนิกา ชมภูนุช และ วรวุฒ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ยูคาลิปตัส

ไม้ยูคาลิปตัส (Eucalyptus) เป็นพันธุ์ไม้ป่ามีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย จัดอยู่ในวงศ์ไมร์เทซิอี้ (Family Myrtaceae) เท่าที่สำรวจพบมีประมาณ 550 กว่าชนิด เป็นไม้ที่ขึ้นเองตามธรรมชาติกระจายกันอยู่ในป่า 2 ลักษณะใหญ่ ๆ คือ พวกที่ชอบที่แล้ง (Dry Sclerophyll Forests) และพวกที่ชอบที่ชื้น (Wet Forests) ซึ่งออสเตรเลียจะเรียกว่า ป่ายูคาลิปตัส (Eucalyptus Forests) ไม้ยูคาลิปตัสแต่ละชนิดมีคุณลักษณะที่แตกต่างกัน บางชนิดมีน้ำมันมากสามารถสกัดไปใช้ประโยชน์ได้ บางชนิดมีลำต้นสวยงามเหมาะสำหรับทำไม้ประดับ และที่สำคัญบางชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตดี สามารถทนต่อพื้นที่แห้งแล้ง พื้นที่ชุ่มมีน้ำขัง ทนต่อสภาพดินเหลว หรือสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ (มนตรี สมศักดิ์ และสัมฤทธิ์, 2529)

ยูคาลิปตัสที่สำคัญของออสเตรเลีย เช่น ยูคาลิปตัสแกรนดิส (*Eucalyptus gradis*), ยูคาลิปตัสซาลิกน่า (*E. saligna*), ยูคาลิปตัสวิมินาลิส (*E. viminalis*), ยูคาลิปตัสไซเพลโลคาร์ป้า (*E. cypellocarpa*), ยูคาลิปตัสไนเทนส์ (*E. nitens*), ยูคาลิปตัสคาโลฟิลล่า (*E. calophylla*), ยูคาลิปตัสแมคคิวลาต้า (*E. maculata*) (ปรัชญา, 2548) ในประเทศไทยเริ่มมีการนำเข้ามาปลูกครั้งแรกที่พระที่นั่งวิมานเมฆสมัยรัชกาลที่ 5 เมื่อปี พ.ศ. 2444

2.3.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Viridiplantae
Infrakingdom	:	Streptophyta
Superdivision	:	Embryophyta
Division	:	Tracheophyta
Subdivision	:	Spermatophytina
Class	:	Magnoliopsida
Superorder	:	Rosanae
Order	:	Myrtales
Family	:	Myrtaceae
Genus	:	*Eucalyptus*

ที่มา: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27189#null (**สืบค้นวันที่** 17 กันยายน 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไม้ยูคาลิปตัส

ต้นยูคาลิปตัส จัดเป็นไม้ยืนต้น ลำต้นตั้งตรง ทรงกลม มีความสูงได้ประมาณ 10 - 25 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มหนาทึบ แตกกิ่งก้านมาก ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เปลือกต้นบางเรียบเป็นมันและลอกออกง่าย เปลือกต้นเป็นสีน้ำตาลอ่อนปนขาว หรือมีสีเทาสลับสีขาวและสีน้ำตาลแดงเป็นบางแห่ง เปลือกนอกจะแตกร่อนเป็นแผ่น และหลุดออกจากผิวของลำต้นเมื่อแห้งจะลอกได้ง่าย ขณะลำต้นยังสดอยู่ เปลือกติดทั่วลำต้น (persistent on full trunk) กิ่งก้านเล็กเป็นเหลี่ยม มีจุดตากลม (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

รูปที่ 2.6 ต้นยูคาลิปตัส

ที่มา: https://medthai.com/ยูคาลิปตัส (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

ใบยูคาลิปตัส เป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับเป็นคู่ ใบห้อยลง ลักษณะสีเขียวเรียวยาวรูปหอก (lanceolate) ปลายใบแหลม ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ใบมีขนาดกว้างประมาณ 2 - 7 เซนติเมตร และยาวประมาณ 12 - 30 เซนติเมตร แผ่นใบหนาเป็นสีเขียวอมสีน้ำเงิน มีผงคล้ายแป้งปกคลุม เส้นใบมองเห็นได้ชัดเจน เส้นกลางใบสีเหลือง ก้านใบสีน้ำตาลแกมเขียว ก้านใบสั้น และมียาวประมาณ 2 เซนติเมตร (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.7 ใบยูคาลิปตัส

ที่มา: https://medthai.com/ยูคาลิปตัส (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

ดอกยูคาลิปตัส ออกดอกเป็นช่อดอกเดี่ยว เกิดตรงระหว่างกิ่งกับใบ มีดอกประมาณ 2 - 3 ดอก ดอกเป็นสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 เซนติเมตร ดอกมีเกสรเพศผู้หลายก้าน ออกดอกเกือบตลอดทั้งปี (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

รูปที่ 2.8 ดอกยูคาลิปตัส

ที่มา: https://medthai.com/ยูคาลิปตัส (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

ผลยูคาลิปตัส ผลมีลักษณะเป็นรูประฆัง หรือคล้ายรูปถ้วย ปลายผลแหลม ผลอ่อนเป็นสีเขียว และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ ดังแสดงในรูปที่ 2.9 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.8 - 2 เซนติเมตร เปลือกผลหนา มีรอยเส้นสี่เหลี่ยม 4 เส้น เมื่อผลแก่ปลายผลจะแยกออก (กรมวิชาการเกษตร, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.9 ผลยูคาลิปตัส

ที่มา : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Distribution.eucalyptus.png (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

2.3.3 สวนประกอบทางเคมีในยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัสสายพันธุ์ต่าง ๆ มีส่วนประกอบทางเคมีอยู่หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โดยพันธุ์ที่ใช้ผลิตน้ำมันหอมระเหย เป็นพันธุ์ที่มีองค์ประกอบทางเคมี คือ Cineole ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ตัวอย่างเช่น *E. globulus* อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Tasmanian blue gum พบมากในแถบโปรตุเกส สเปน และจีน การสกัดกลั่นโดยใช้ไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.7 - 2.4 *E. citriodoria* เป็นพันธุ์ที่มีกลิ่นเป็นเอกลักษณ์ แตกต่างจากยูคาลิปตัสพันธุ์อื่น เพราะมีองค์ประกอบของ Citronellal อยู่มาก จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Lemon scented gum พบมากในแถบประเทศบราซิล แอฟริกาใต้อินโดนีเซีย โมรอคโค และกัวเตมาลา การสกัดกลั่นโดยใช้ไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 1.2 *E. polybractea* เป็นพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยในออสเตรเลียการสกัดกลั่นโดยใช้ไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.7 - 5.0 (กรกนก และ วนิดา, 2558)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของยูคาลิปตัสพันธุ์ต่าง ๆ

ยูคาลิปตัส	องค์ประกอบทางเคมี
E. globulus	Alpha-pinene (10.66%), Limonene (3.29%), 1,8-cineole (69.10%), Terpineol (0.22%), Globulol (5.33%) และ Alpha-phellandrene (0.09%)
E. citriodoria	Alpha-pinene (0.14%), Citronellal (80.1%), Isopluegol (3.41%), Citronellol (4.18%) และ Linalool (0.66%)
E. polybractea	Alpha-pinene (0.90%), Limonene (1.10%), 1,8-cineole (91.90%), Terpineol (0.51%) และ Globulol (0.05%)

ที่มา : กรกนก และ วนิดา (2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การปรับสภาพ (Pretreatment)

กระบวนการปรับสภาพ (วัชรี, 2556) คือ การเปลี่ยนหรือกำจัดโครงสร้างและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เป็นสิ่งกีดขวาง ต่อกระบวนการย่อยเซลลูโลส เพื่อช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อยดีขึ้นและผลที่ได้คือผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้น ดังนั้นการปรับสภาพจึงถือเป็นขั้นตอนสำคัญในการเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส วัตถุประสงค์ของกระบวนการปรับสภาพคือ กำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออกเพื่อลดโครงสร้างแบบผลึกของเซลลูโลส เพิ่มพื้นที่ผิวเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัสดุชีวมวล ซึ่งกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งได้เป็น 4 วิธีหลัก ๆ ซึ่งแต่ละวิธีมีวิธีย่อยลงไปอีกดังนี้

2.4.1 การปรับสภาพทางกล (Mechanical pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบหรือการเพิ่มพื้นที่เพื่อให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ข้างในถูกย่อยสลายได้มากขึ้น โดยการหั่น การสับ การทุบ หรือการบดด้วยลูกบอลหรือลูกกลิ้งจัดว่าเป็นวิธีการที่ให้ผลสำเร็จเป็นอย่างดีและมีต้นทุนต่ำและยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการช่วยย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้เปลี่ยนไปเป็น กลูแคน และไซแลนในขั้นตอนต่อไป

2.4.2 การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment)

การเพิ่มอุณหภูมิและการแผ่รังสีเป็นวิธีการมีก๊าซเฉื่อยและตัวออกซิแดนท์สามารถทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินย่อยสลายได้ดี ส่วนวิธีการทางกายภาพที่ประสบผลสำเร็จมากที่สุดวิธีหนึ่ง วิธีการที่เรียกว่า Thermogravimeric treatment โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 1100 K ภายใต้สภาวะทั้งที่เผาแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Pyrolysis) พวกเปลือกถั่วชนิดต่าง ๆ ฟางข้าว หรือพวกขี้เลื่อยที่อุณหภูมิ 600 - 1200 K ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นพวกถ่านของเหลวและก๊าซมากกว่าวิธีธรรมดาทั่วไป 55%

สำหรับการแผ่รังสีด้วยคลื่นไมโครเวฟที่ 700 W ด้วยเวลานานต่าง ๆ กัน พบว่ามีการสูญเสียน้ำหนักของวัตถุดิบไปบ้าง เนื่องจากมีการสลายตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน แต่ทำให้อัตราการย่อยสลายโดยใช้ด่างร่วมด้วยเพิ่มขึ้นมาก นอกจากนี้การใช้รังสีแกมม่าขนาด 500 kGy ทำให้โครงสร้างของฟางข้าวสาลีที่ป่นเป็นผงขนาด 140 mesh แตกตัวให้ผลผลิตน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นอีก 13.40%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี (Physicochemical pretreatment)

การรวมกันระหว่างวิธี chemical และ physical treatment มีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของเฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอน hydrolysis เพิ่มขึ้น Physicochemical pretreatment รวมกับ Thermochemical treatment เช่น วิธี steam explosion, ammonia fibre explosion, CO_2 explosion, SO_2 explosion อุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง 160 - 260 °C กระทำภายใต้ความดัน 0.69 - 4.83 MPa ที่มีไอน้ำอิ่มตัวเป็นเวลาหลายวินาที หรือ 2 - 3 นาที ก่อนที่จะปรับลดลงมาอยู่ที่ความดันปกติวิธี wet oxidation pretreatment กระทำ ณ อุณหภูมิระหว่าง 200 - 210 °C และมีการเติมด่าง หรือ Na_2CO_3 ร่วมด้วยซึ่งจะนำไปสู่การละลายที่ดีขึ้นของสารพวกลิกโนเซลลูโลสิก และยังทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า (value-added products) โดยการใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ให้ผลดีขึ้นส่วนวิธี Liquid hot water (LHW) pretreatment โดยการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 170 - 230 °C ความดัน 5 MPa นานหลายนาทีจึงปรับคืนสู่ความดันปกติวิธีนี้ ทำให้เฮมิเซลลูโลสในพวกชานอ้อย, เส้นใยข้าวโพด, และพวกฟางข้าวต่าง ๆ แตกตัวเป็นไซโลสได้ถึง 45 - 65% (ปิยะนุช, 2557)

การใช้สารละลายเบสเจือจางและความร้อนภายใต้ความดันสูงในการปรับสภาพ ซึ่งประสิทธิภาพการย่อยสลายนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายเบสและความร้อนที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่าอัตราการย่อยสลายสลายลดลงเมื่อความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาลที่เกิดขึ้นเปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอร์ฟูรัล ฟอร์มัลดีไฮด์ หรือกรดฟอร์มิก เป็นต้น ซึ่งเป็นตัวขัดขวางขั้นตอนการย่อยสลายชนิดของสารละลายเบสเจือจางที่นิยมใช้กัน (ชัชนันท์ และเฉลิม, 2555) เช่น

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้มากที่สุด สามารถกำจัดลิกนินได้ดี เนื่องจาก NaOH เป็นเบสแก่ ซึ่งในบางครั้ง NaOH ไม่ได้กำจัดลิกนินออกไปเพียงอย่างเดียว แต่อาจทำลายเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วนออกไปด้วย ดังนั้นการใช้ NaOH จึงจำเป็นต้องใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ๆ ผลผลิตที่ได้จึงจะมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Wang และคณะ, 2010)
- แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ไม่น้อยไปกว่า NaOH แต่เนื่องจาก NH_4OH เป็นเบสอ่อน จึงต้องใช้เวลาในการกำจัดลิกนินนานกว่าเล็กน้อย แต่ปัญหาที่พบจากการใช้ NH_4OH คือ การกำจัดลิกนินออกไม่หมด และอาจมีกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแก๊สแอมโมเนียที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน (Gupta และ Lee, 2010)

- โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้น้อยที่สุด แต่เป็นสารที่กำจัดลิกนินได้ดีที่สุด โดยที่ Na_2S จะมีความจำเพาะเจาะจงกับลิกนินเท่านั้น โดยจะไม่มีผลต่อเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลส เหตุผลที่นิยมใช้ Na_2S ค่อนข้างน้อย ก็อาจเนื่องจากกลิ่นของแก๊สไข่เน่าที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายลิกนิน แต่อย่างไรก็ตาม Na_2S ยังคงใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่จำเป็นต้องกำจัดลิกนินออกเท่านั้น เช่น อุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ

2.4.4 การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment)

สารเคมีตั้งแต่ พวก oxidizing agents พวกกรดต่าง ๆ ไปจนกระทั่งถึงด่างสามารถย่อยสลาย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้และสามารถทำภายใต้ความดันและอุณหภูมิปกติได้ (สุภาวดี, 2557) ตัวอย่างเช่น

1. การทำปฏิกิริยากับโอโซน (Ozonolysis) โอโซนสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสได้ เช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย หญ้า พืชถั่ว ไม้สน ก๊าซโอโซนเป็นสารออกซิแดนท์ที่ดีสามารถละลายน้ำได้ สามารถเข้าไปแตกโครงสร้างของลิกนินและปลดปล่อยสารประกอบที่ละลายน้ำได้ และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนิน ไม่ผลิตสารตกค้างที่เป็นพิษต่อกระบวนการต่อไปและปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง
2. การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง (Alkali pretreatment) เป็นกระบวนการที่ง่ายและไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยกรด และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายชีวมวล สารเคมีที่นิยมใช้ในการปรับสภาพด้วยด่าง ได้แก่ sodium hydroxide, ammonia และ ammonium sulfite
3. การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด (Acid pretreatment) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยเซลลูโลสได้ ซึ่งกรดที่นิยมใช้ได้แก่ sulphuric acid, hydrochloric acid และ phospholic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การทำปฏิกิริยาด้วยการออกซิเดชัน (oxidative delignification) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไปได้ และปฏิกิริยาสามารถดำเนินได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันห้อง เช่น hydrogen peroxide

2.4.5 การปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการปรับสภาพที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลชีพเหล่านี้ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น white-rot, brown-rod และชนิดที่เป็น soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้ โดย brown-rod มีบทบาทสำคัญในการย่อยพวกเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot และ soft-rot จะเข้าย่อยสลายพวกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส เชื้อราและแบคทีเรียเหล่านี้ได้แก่ *Aspergillus terreus, Trichoderma spp, Cyathus stercoreus, Penicillium camemberti, Phanerochaete chrysosporium, Streptomyces griseus* ฯลฯ เป็นต้น (รัชพล, 2558)

2.5 การย่อย (Hydrolysis)

เนื่องจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังนั้นเมื่อทำการย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมา โดยถ้าการย่อยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสนั้นจะได้น้ำตาลหลายชนิดปะปนกัน ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส รวมทั้งสารอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจากการย่อย สำหรับการย่อยมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีการย่อยด้วยกรด และวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ (สูไฮลา, 2559)

2.5.1 การย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis)

สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เนื่องจากมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไป ทำให้ได้ผลพลอยได้อื่น ๆ ได้แก่ เฟอร์ฟูรัล นอกจากนี้กรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 70% ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40% ขึ้นไป กรดซัลฟิวริกเจือจาง 1% เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140 - 160 °C ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรง และไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนจึงมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ราคาแพงนอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีกรดเจือปน (ประมุข, 2555)

2.5.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

ลิกโนเซลลูโลส มีองค์ประกอบสำคัญคือ เซลลูโลสซึ่งเซลลูโลสมีโครงสร้างที่เป็นกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-Glucosidic linkage (สูไฮลา, 2559) ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์เชิงซ้อน 3 ส่วน ดังนี้

1. Endoglucanase (EG; 1, 4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.4) ทำหน้าที่ย่อย β-1,4-glucosidic linkage โดยจะตัดแบบสุ่มภายในสายจะได้ cello-oligosaccharide, glucose, cellobiose
2. Exoglucanase หรือ cellobiohydrolase (CBH; 1, 4-β-D-glucan cellobio-hydrolase; EC 3.2.1.91) ทำหน้าที่ร่วมกับ Endoglucanase ในการย่อยเซลลูโลสจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ cellobiose
3. β-glucosidase (β-D-glucohydrolase; EC 3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย cellobiose และcellooligosaccharide ได้เป็นกลูโคส เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีน เท่ากับ 1:1 ละลายน้ำได้ดีไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นในการเร่ง

โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน 50 °C แต่อาจจะต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 °C ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำผลิต เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบด้วยโครงสร้างผลึก หรือส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline region) และส่วนที่ไม่มีระเบียบ (amorphous region) เอนไซม์ endoglucanase จะเข้าไปย่อยสลายส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ ทำให้เส้นใยเซลลูโลสขาดเป็นช่วง ๆ เอนไซม์ exoglucanase เข้าไปย่อยส่วนปลายของเส้นใยที่ขาดออกมา จากนั้นโมเลกุลของเซลลูโลสจะถูกย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลที่สั้นลงโดยเอนไซม์ exoglucanase และโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-glucosidase ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส และโมเลกุลที่สั้นลงนั้นถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β-glucosidase ให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกลูโคส

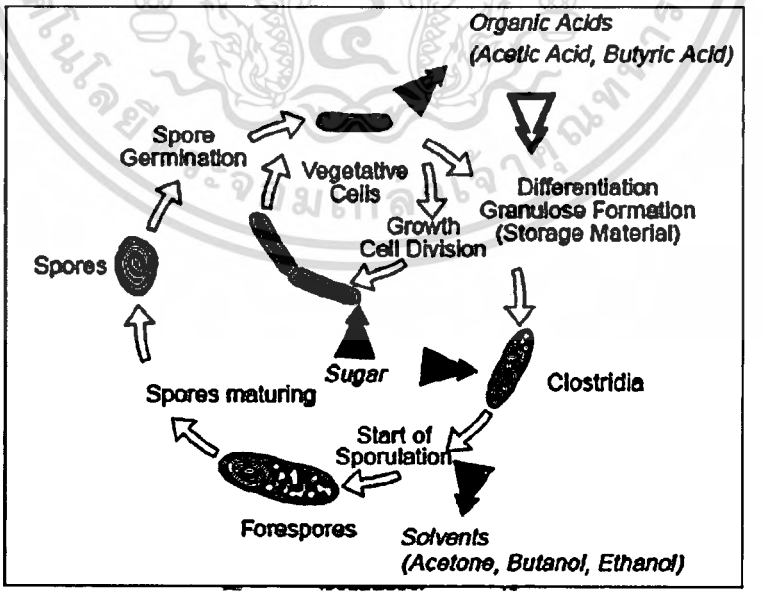
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 *Clostridium* sp.

Clostridium sp. มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ พบได้ทั่วไปในน้ำ ดิน ตามพืชผักต่าง ๆ บางสปีชีส์เป็นเชื้อประจำถิ่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีเพียง 2 - 3 สปีชีส์ ในลำไส้ที่ก่อให้เกิดโรค (Elena และคณะ, 2001)

วงจรชีวิตและการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. (สุนทร และอภิชัย, 2555) สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.10 ได้แก่

1. การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods-shaped) ซึ่งอาจจะพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกัน เป็นสายโซ่ยาว
2. รูปร่างแบบครอสตริเดีย เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ (Cigar-shape) การเจริญในขั้นนี้ เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้น
3. Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป
4. รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่า สปอร์ เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม



รูปที่ 2.10 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*

ที่มา : สุนทร กาญจนทวี และอภิชัย สาวิสิทธิ์ (2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

Clostridium sp. (Wiegel, Tanner และ Rainey, 2006 ; ธิตินาท, 2527) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ดีเอ็นเอ mol% G + C ต่ำ ซึ่งมีลักษณะของผนังเซลล์จะมีมูรีน (murein ; peptidoglycan) รูปร่างเป็นท่อนตรงสั้น เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาแบบรอบตัว (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์ ตำแหน่งเอนโดสปอร์จะอยู่ค่อนไปทางปลายด้านใดด้านหนึ่ง ไม่มีเอกโซสปอร์เรียม ไม่มีรยางค์ ผนังเซลล์ประกอบไปด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะของโคโลนีเป็นแบบกลม ขอบไม่เรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 5 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีครีม ผิวมัน และโปร่งแสง เจริญได้ดีในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถรีดิวไนโตรเจนได้เล็กน้อย ผลผลิตจากกระบวนการหมักจะได้กรดอะซิติก กรดบิวทิริก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

2.6.2 อนุกรมวิธาน

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Clostridia

Order: Clostridiales

Family: Clostridiaceae

Genus: *Clostridium*

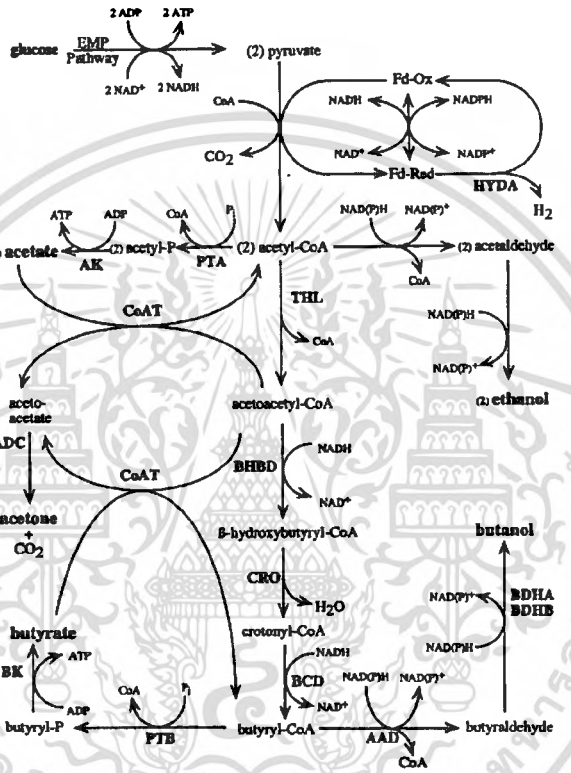
ที่มา : Prazmowski (1880)

2.6.3 กระบวนการเมตาบอลิซึมที่ผลิตบิวทานอล

ไบโอบิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol fermentation) หรือเรียกว่า การหมัก ABE ซึ่งมีแบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้ โดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่นิยมใช้มากที่สุด มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากหลายแหล่ง ปัจจุบันแบคทีเรียในสกุลนี้ที่สามารถใช้ในการหมัก ABE ได้แก่ *Clostridium beijerinckii*, *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. saccharobutylicum* แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* สามารถใช้แหล่งของคาร์บอนได้หลายชนิดเช่น กลูโคส, ซูโครส, แลคโทส, ไซโลส, ไซแลน, แป้ง และกลีเซอรอล โดยแหล่งคาร์บอนเหล่านี้มีอยู่หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถผลิตได้จากชีวมวลที่มีอยู่มากมาย กลไกการหมัก ABE ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ การผลิตกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ในขั้นตอน Acidogenesis ตามด้วยการผลิตตัวทำละลาย ABE ในขั้นตอน Solventogenesis โดยแบคทีเรียจะผลิตตัวทำละลาย ABE ผ่านกระบวนการเมแทบอไลต์เป็นไพรูเวท จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องเปลี่ยนเป็นอะซิติลโค-เอ, อะซิโตอะซิติลโค-เอ และบิวทาริวโค-เอ ตามลำดับ ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ ตัวทำละลาย บิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล ดังที่มีวิถีในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 วิถีการสร้างอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส (phosphotransacetylase) AK แทนอะซิเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซิโตอะซิติล-โคเอ: อะซิเตต-บิวทิเรต: โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-CoA: acetate-butyrate: CoA transferase) AADC แทนอะซิโตอะซิเตต ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutyrylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส (butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde / alcohol dehydrogenase) BDHA & BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส บี (butanol dehydrogenase A & B)

ที่มา : Desai, Nielsen และ Papoutsakis (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kang และคณะ (2011) ทำการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตบิวทานอลจากตะกอนกระดาษที่กำจัดเถ้าออก โดยใช้วิธี Simultaneous Saccharificatin and Fermentation (SSF) และ Simultaneous Saccharificatin and Co-Fermentation (SSCF) เพื่อแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการผลิตบิวทานอลจากตะกอนกระดาษ ซึ่งพบว่าการมีปริมาณเถ้าในตะกอนสูงส่งผลให้ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ต่ำเนื่องจากขีดจำกัดของน้ำหนักของแข็งภายในถังหมัก ปัญหาที่เกิดขึ้นส่งผลให้มีการกำจัดเถ้าออกโดยการทำให้ตะกอนลอยด้วย CO_2 ที่ความเร็วในการกวน 300 rpm เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งฟองของ CO_2 จะถูกปล่อยผ่าน glass tubing และกรองผ่านตะแกรงที่มีขนาดรูพรุน 100 mesh ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการ SSF และ SSCF ในการทดลองใช้ Paper Sludge (PS) เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนหมัก โดยวิธีการ SSF ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* และ SSCF ใช้แบคทีเรีย *E. coli* ATCC-55124 (KO11) พบว่า PS ที่ผ่านกระบวนการการกำจัดเถ้าออกจนมีปริมาณเถ้าในกากตะกอนต่ำ และการใช้เอนไซม์ cellulose 10 FPU/g-glucan และ beta-glucosidase 20 CBU/g-glucan จะช่วยเพิ่มผลได้ของเอทานอลที่ผ่านวิธีการ SSF และ SSCF โดยมีค่าผลได้อยู่ที่ 72.8% และ 73.6% ตามลำดับ การเปลี่ยนอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักตามห้องปฏิบัติการ (เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์) เป็น corn steep liquor (CSL) ไม่ส่งผลเสียต่อกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งการหมักแบบ fed-batch ของ SSCF และ SSF ส่งผลให้ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นถึง 47.8 กรัมต่อลิตร และ 60.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Piyoungkoon และ Benjamas (2011) ได้นำทะลายปาล์มเปล่า (Palm Empty Fruit Bunches, PEFB) มาใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไบโอบิวทานอลด้วยแบคทีเรีย *Clostidium acetobutylicum* โดยนำ PEFB มาใช้ในการทดลองเพื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์เจือจางเพื่อให้ได้น้ำตาล ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการหมัก การย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0 - 2.0% พบว่าความเข้มข้นที่ 0.5 - 2.0% ให้ค่าน้ำตาลอยู่ที่ 44 - 49 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการศึกษานี้พิจารณาผลได้ของน้ำตาลที่ได้จากความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 0.5% เนื่องจากลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมให้น้อยที่สุด และเมื่อนำ PEFB ที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% รวมทั้งการปรับสภาพร่วมระหว่างกรด-เบส มาย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase พบว่าน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ PEFB ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ค่าน้ำตาลสูงสุดเมื่อผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์คือ 16.43 กรัมต่อลิตร ขณะที่กรดซัลฟิวริกให้ 10.14 กรัมต่อลิตร และกรด-เบสให้ 6.50 กรัมต่อลิตร กระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acetone - Butanol - Ethanol (ABE) ด้วยแบคทีเรีย *Clostidium acetobutylicum* ในอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร จากสารที่ได้จากการย่อยสลายทะลายปาล์มเปล่าด้วยเอนไซม์ที่ 168 ชั่วโมง ให้ผลการผลิต ABE ทั้งหมดสูงสุดถึง 1.262 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 0.216 กรัมต่อลิตร บิวทานอล 0.77 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.269 กรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับสารที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดคือ 1.058 กรัมต่อลิตร (กรดอะซิติก 0.274 กรัมต่อลิตร และกรดบิวทิริก 0.423 กรัมต่อลิตร)

Watchara และ Benjamas (2011) พัฒนากระบวนการผลิต Acetone - Butanol - Ethanol (ABE) จากการใช้เส้นใยปาล์ม (Palm Press Fiber, PPF) ซึ่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับกระบวนการหมัก ในการทดลองทำการปรับสภาพ PPF ด้วยน้ำ กรดซัลฟิวริก 0.5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% และเบสร่วมกับกรด พบว่าการปรับสภาพร่วมกันระหว่างเบสตามด้วยกรดให้ค่าเซลลูโลสสูงสุดถึง 76.32% ซึ่งสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินให้เหลือเพียง 6.45 และ 7.85% ตามลำดับ ในการผลิต ABE โดยใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพ PPF มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวของแบคทีเรีย *Clostidium acetobutylicum* DSM 1713 และการเพาะเลี้ยงแบบผสมระหว่างแบคทีเรีย *Clostidium acetobutylicum* DSM 1713 กับ *Bacillus cellulolyticus* JCM 9156 โดยการเติมและไม่เติมเอนไซม์ cellulase พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเดี่ยวและแบบผสมโดยการเติมเอนไซม์ cellulase 30 ยูนิต ให้ค่าผลผลิต ABE อยู่ที่ 3.97 และ 3.95 ตามลำดับ ที่ 144 ชั่วโมง แม้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบผสมจะไม่ช่วยในการผลิต ABE แต่สามารถลดการใช้ตัวรีดิวซ์และก๊าซไนโตรเจนได้ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ABE ในการเพาะเลี้ยงแบบผสมโดยใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพ PPF ปริมาตร 5.0 กรัมต่อลิตร PPF และโปรตีนถั่วเหลืองที่แยกได้ (ISP) 9.0 กรัมต่อลิตร ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 60 rpm ตามด้วยการเติมเอนไซม์ cellulase 30 ยูนิต ที่สภาวะนี้ทำให้ได้ ABE อยู่ที่ 4.95 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 144 ชั่วโมง

Cho และคณะ (2013) ศึกษาการผลิต Acetone -Butanol - Ethanol (ABE) ด้วยวิธีการปรับสภาพด้วยแอลคาไลน์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์และการหมักโดยใช้แผ่นไม้จากต้นเยลโลพอปลาร์ (Yellow poplar) เป็นวัตถุดิบตั้งต้น การปรับสภาพด้วยแอลคาไลน์มีชีวมวลเหลืออยู่ 51.1% ส่วนประกอบของไม้หลังจากการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ cellulases (celluclast 1.5 ลิตร และ Novozym 342) โดยใช้อุณหภูมิ 30 - 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และรักษาอุณหภูมิ 170 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถกำจัดลิกนินได้ 94.3% และไซแลนได้ 92.0% ค่าผลได้ของเซลลูโลส-กลูโคส คือ 80.9% และไซแลน-ไซโลส คือ 80.9% องค์ประกอบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีกลูโคส 95.1 กรัมต่อลิตร และไซโลส 21.4 กลัมต่อลิตร ของเหลวที่ได้จากการย่อยมีกรดอะซิติก 0.5 กรัมต่อลิตร และฟีนอลิกทั้งหมด 0.5 กรัมต่อลิตร ไม่พบเฟอร์ฟูรัลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัล (5-HMF) ซึ่งของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายต้นเยลโลพอปลาร์ด้วยเอนไซม์ (Yello Poplar Hydrolysate, YPH) ถูกนำมาใช้ในการผลิต ABE โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* และ *Clostridium beijerinckii* ในกระบวนการหมัก YPH โดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* สามารถผลิต ABE ทั้งหมดได้ 18.1 กรัมต่อลิตร โดยผลิต 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลได้ 0.42 ส่วนแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* สามารถผลิต ABE ทั้งหมดได้ 12.1 กรัมต่อลิตร โดยผลิต 0.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลได้ 0.37 กรัมต่อลิตร

Shukor และคณะ (2014) ทำการวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการหมัก Acetone - Butanol - Ethanol (ABE) สำหรับการผลิตบิวทานอลโดย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 จากกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (palm kernel cake, PKC) ซึ่งเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่เหลือล้นและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจในประเทศมาเลเซีย โดยการนำ PKC มาปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางความเข้มข้น 7% (v/v) และกำจัดสารพิษของสารที่ได้จากการย่อยสลายก่อนนำไปใช้ในการผลิตบิวทานอลด้วยเรซิน XAD-4 และถ่านกัมมันต์ ผลการทดลองพบว่าเมื่อปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกได้น้ำตาลแมนโนสความเข้มข้น 33.6 ± 0.13 กรัมต่อลิตร กลูโคส 1.95 ± 018 กรัมต่อลิตร และไซโลส 0.36 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ในส่วนของการกำจัดสารพิษด้วยเรซิน XAD-4 สามารถกำจัดเฟอร์ฟูรัลได้ 50% และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์ฟูรัลได้ 77.42% ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่กู้คืนได้จากการกำจัดสารพิษของสารที่ได้จากการย่อยสลายได้กลูโคส 3.58 ± 0.25 กรัมต่อลิตร และแมนโนส 39.66 ± 0.20 กรัมต่อลิตร ส่วนการกำจัดสารพิษด้วยถ่านกัมมันต์ได้กลูโคส 3.19 กรัมต่อลิตร และแมนโนส 40.31 ± 0.41 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์แบบจำลองเชิงประจักษ์พบว่าผลกระทบเชิงเส้นของปริมาณกล้าเชื้อมีผลต่อสมการกำลังสองของค่าพีเอชและปริมาณกล้าเชื้อต่อการผลิตบิวทานอลที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p < 0.01$) และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลคือพีเอช 6.28 อุณหภูมิในการบ่ม 28 องศาเซลเซียส และปริมาณกล้าเชื้อ 15.9% ได้บิวทานอล 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเจือจางสารที่ได้จากการย่อย PKC เพิ่มขึ้นถึง 70% (v/v) ช่วยเพิ่มการผลิตบิวทานอลและ ABE ที่ความเข้มข้นสูงสุด 3.59 กรัมต่อลิตร และ 5.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sampedro และคณะ (2014) ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำและการอบด้วยไอน้ำของแผ่นไม้ *Eucalyptus globulus* ที่สภาวะความรุนแรงเดียวกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ของ *E. globulus* โดยทำการปรับสภาพแผ่นไม้ *E. globulus* 2 รอบ รอบแรก 5 นาที และรอบสอง 3 นาที ที่อุณหภูมิ 183 องศาเซลเซียส หลังจากวัสดุผ่านการปรับสภาพแล้วจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Celluclast 1.5 ลิตร และ β-glucosidase (Novozyme 188) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่าที่สภาวะความรุนแรงเดียวกันการระเบิดด้วยไอน้ำมีการกำจัดเฮมิเซลลูโลสและมีการปล่อยผลิตภัณฑ์ย่อยสลายซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทั้งนี้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดได้รับจากกลุ่มตัวอย่างที่มีปริมาณลิกนินต่ำหลังจากผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยผลได้การย่อยสลายจากการปรับสภาพด้วยการอบด้วยไอน้ำสูงกว่าการปรับสภาพด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ ซึ่งให้ค่าผลได้สูงสุดของน้ำตาลกลูโคส 46.7% ไซโลส 73.4% และผลได้ของน้ำตาลทั้งหมด 53.5% การยับยั้งเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณและการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของลิกนินที่เกิดจากการปรับสภาพ

Zheng และคณะ (2015) ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารที่ได้จากยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยสลายมาใช้ในการผลิต ABE ด้วยแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 โดยไม่ต้องใช้สารอาหารเสริมใดๆ ในการทดลองทำการปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ และย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบในการกวน 120 rpm พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแข็งในสารละลายยูคาลิปตัสจาก 6.7% เป็น 25% (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) ทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจาก 33.7 กรัมต่อลิตร เป็น 86.7 กรัมต่อลิตร หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ cellulase และการผลิต ABE จากสารที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัสได้ค่าการผลิต ABE สูงสุดคือ 12.3 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 7.72 กรัมต่อลิตร, อะซิโตน 4.07 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.467 กรัมต่อลิตร) ได้จากความเข้มข้นของแข็งเริ่มต้น 10% และความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นประมาณ 40 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิต ABE จะถูกยับยั้งโดยสารตั้งต้นและตัวยับยั้งการหมักเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสูงกว่า 45 กรัมต่อลิตร ในสารที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัส ดังนั้นการเจือจางสารที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัสความเข้มข้นของแข็งเริ่มต้น 25% และความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความเข้มข้น ABE เพิ่มขึ้นเป็น 13.1 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 8.16 กรัมต่อลิตร, อะซิโตน 4.27 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.643 กรัมต่อลิตร) ผลผลิต ABE 0.109 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ ABE เท่ากับ 0.413 กรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amiri และ Karimi (2015) ศึกษาการผลิต Acetone -Butanol - Ethanol (ABE) จากไม้สน และไม้เอล์ม โดยวิธีการการปรับสภาพด้วยการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเอง การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และการหมักโดย *Clostridium acetobutylicum* การย่อยสลายของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ส่งผลให้มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด 10 - 19 กรัมต่อลิตร จากสารที่ได้จากการย่อยสลายเซลลูโลส (cellulosic hydrolysate) ในทางตรงกันข้าม สารที่ได้จากการการย่อยสลายโดยรวม (overall hydrolysate) มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสูงถึง 20.8-23.2 กรัมต่อลิตร โดยการหมัก cellulosic hydrolysate และ overall hydrolysate พบความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล 2.4-6.8 กรัมต่อลิตร และค่าผลได้สูงสุด 117.6 กรัม ได้จากการหมัก cellulosic hydrolysate ของเอล์ม และค่าผลได้ของการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลสูงสุดจากสนกิโลกรัมละ 104.8 กรัม จากการหมัก overall hydrolysate

Wenjian และคณะ (2016) ทำการศึกษาวิจัยกระบวนการหมักแบบ Simultaneous Saccharificatin and Fermentation (SSF) สำหรับการผลิต Acetone - Butanol - Ethanol (ABE) โดยใช้ Paper mill sludge (PS) ของแข็งเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมัก ABE จากตะกอนกระดาษโดยใช้แบคทีเรีย *Clostidium acetobutylicum* จำเป็นจะต้องมีการกำจัดเถ้าบางส่วนใน PS ออก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยด้วยเอนไซม์ การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ cellulase ใน SSF ที่มีการกำจัดเถ้าใน PS ออกโดยการเพิ่มของแข็ง 6.3 - 7.4% และเอนไซม์ 10 - 15 FPU/g-glucan เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 rpm ทำให้ได้ผลได้สารละลายสุดท้ายสูงสุด 0.27 g/g sugar ซึ่งข้อดีของการใช้ PS เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการผลิตบิวทานอลคือไม่ต้องทำการปรับสภาพและควบคุมพีเอช ในกระบวนการหมัก ABE จากน้ำตาล

Amiri และ Karimi (2016) ได้นำไม้สน และเอล์ม มาผ่านการปรับสภาพสองขั้นตอน คือ การย่อยสลายที่เกิดขึ้นเองและการกำจัดลิกนินด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งนำมาใช้ก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Cellic CTec2 และ Cellic HTec2 และการหมักโดย *Clostridium acetobutylicum* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อการปรับปรุงการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) จากฟางข้าว สน และเอล์ม เพื่อนำไปผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ให้ค่าผลได้ของการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเอล์มเพิ่มขึ้นเป็นกิโลกรัมละ 133 กรัม ซึ่งเป็นค่าที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้จากในห้องปฏิบัติการ (บุษบา, 2560) โดยเก็บกล้าเชื้อในกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.2 สารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid

กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)

กรดซิตริก (Citric acid)

กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (Boric acid)

กรดบิวทิริก (Butyric acid)

กรดแลคติก (Lactic acid)

กรดอะซิติก (Acetic aicd)

กลีเซอรอล (Glycerol)

กลูโคส (Glucose)

ซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริกโมโนไฮเดรต (Cysteine – HCl · H_2O)

เซลโลไบโอส (cellobiose)

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

ไซโลส (Xylose)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

บิวทานอล (Butanol)

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เมทานอล (Methanol)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วุ้น (Agar)

สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5

อะซิโตน (Acetone)

อาหาร Reinforced clostridial

เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol)

เอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 **จากบริษัท** Siam Victory Chemicals **จำกัด**

3.1.3 อุปกรณ์

กรวย	จุกยางดูดสาร
กรวยกรองบุชเนอร์	ตู้เย็น
กระดาษกรอง	ตู้ปลอดเชื้อ
กระดาษวัดพีเอช	ตะแกรงร่อน
กระบอกตวง	ตู้บ่มเชื้อ
กล้องจุลทรรศน์	ตู้อบลมร้อน
ขวดเก็บตัวอย่าง	โถดูดความชื้น
ขวดดูแรน	แท่งแก้วคนสาร
ขวดน้ำกลั่น	บีกเกอร์
ขวดปรับปริมาตร	ปิเปตแก้ว
ขวดรูปชมพู่	แผ่นดูดอาการ
คิวเวต	พาราฟินออยล์
เครื่อง HPLC	ไมโครปิเปต
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	ลูปเขี่ยเชื้อ
เครื่องปั่นเหวี่ยง	หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
เครื่องผสมสาร	หลอดทดลอง
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	หลอดปั่นเหวี่ยง
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	หลอดทดลองฝาเกลียว
จานเพาะเชื้อ	แอนแอโรบิกจาร์
จุกสำลี	อ่างควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 ยูคาลิปตัส

ยูคาลิปตัส นำมาจากตำบลบ้านสำโรงธรรม อำเภอไพรบึง จังหวัดศรีษะเกศ ประเทศไทย ส่วนที่นำมาเป็นส่วนกิ่งที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridium Medium (HIMEDIA®)

อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Cysteine hydrochloride	0.05	กรัม
Soluble starch	1	กรัม
Agar	1	กรัม

ชั่งอาหาร Reinforced Clostridium Medium 30.05 กรัม, Glucose 5 กรัม Sodium chloride 5 กรัม, Cysteine hydrochloride 0.45 กรัม และเติมน้ำบริสุทธิ์ปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 อาหาร T6

อาหาร T6 (ดัดแปลงมาจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata และคณะ, 1993) มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	6	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร
Dipotassium hydrogen phosphate	0.5	กรัมต่อลิตร
Magnesium Sulphate Tetrahydrate	0.3	กรัมต่อลิตร
Ferrous sulfate Pentahydrate	0.01	กรัมต่อลิตร
Ammonium acetate	3	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.5	กรัมต่อลิตร
Glucose	50	กรัมต่อลิตร

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารนำมาละลายน้ำบริสุทธิ์และปรับปริมาตรจนได้ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อใช้สำหรับเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ และเป็นชุดควบคุมในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารชุดทดลองมี 2 สูตร คือ อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส เตรียมเหมือนอาหาร T6 ในชุดควบคุม แต่เปลี่ยนจากกลูโคสเป็นสารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัส โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส คือ สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัส โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

3.3 การเตรียมกิ่งไม้ยูคาลิปตัส

นำไม้ยูคาลิปตัสมาปอกเปลือกออกจนหมด ทำให้แห้งสนิทด้วยการตากแดด จากนั้นหั่นกิ่งไม้ยูคาลิปตัสเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีความยาวประมาณ 5-10 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1.5 เซนติเมตร แล้วนำมาบดให้ละเอียดเป็นผงขนาดประมาณ 75–300 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องบดแบบใบตี (Hammer Mill) ทำจากสแตนเลส food grade (SUS304) จากนั้นเก็บผงไม้ยูคาลิปตัสไว้ในถุงพลาสติกที่ปิดซ้ำ เพื่อทำการวิเคราะห์การวิเคราะห์องค์ประกอบ (Proximate analysis) และนำไปทำการปรับสภาพเพื่อผลิตน้ำตาลรีดิวซ์

3.4 การปรับสภาพไม้ยูคาลิปตัส

3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

ชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัสปริมาณ 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 6.8 - 7.0 นำไปเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และถ้ายังมีเศษตะกอนหลงเหลืออยู่ให้นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1

ส่วนใสที่กรองได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และนำตะกอนอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนจนแห้งแล้วใส่เดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์

3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด

ชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัสปริมาณ 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และถ้ายังมีเศษตะกอนหลงเหลืออยู่ให้นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1

ส่วนใสที่กรองได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และนำตะกอนไปล้างด้วยน้ำประปาจนกว่าพีเอชของน้ำล้างจะเท่ากับพีเอชของน้ำประปา จากนั้นนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนจนแห้งแล้วใส่เดซิเคเตอร์ เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์

3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส

ชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัส 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเบสโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และถ้ายังมีเศษตะกอนหลงเหลืออยู่ให้นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1

ส่วนใสที่กรองได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และนำตะกอน ไปล้างด้วยน้ำประปาจนกว่าพีเอชของน้ำล้างจะเท่ากับพีเอชของน้ำประปา จากนั้นนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนจนแห้งแล้วใส่เดซิเคเตอร์เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์

3.5 กระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์

นำยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งมาเติมเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 โดยเอนไซม์ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 และ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเอนไซม์ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส ซึ่งเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase 2500 U, กิจกรรมของเอนไซม์ Beta-Glucosidase 612.5 U) และนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1 ส่วนใสที่กรองได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การผลิตบิวทานอล

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการถ่ายเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาถ่ายลงเชื้อลงบนอาหารแข็ง Reinforced Clostridium Medium นำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในอาหาร T6 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร T6 ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร และบ่มในสภาวะเดิม เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ

3.6.2 การหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

ถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้หัวข้อ 3.6.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ใส่อาหาร T6 ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 180 มิลลิลิตร โดยใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุดทดลอง 2 ชุด คือ อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นหยดพาราฟิน ออยล์ 40 มิลลิลิตร เพื่อทำให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงเพื่อนำตะกอนเซลล์มาวิเคราะห์น้ำหนักแห้งของเซลล์และความขุ่นของอาหาร นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liqiud Chromatography; HPLC) และวิเคราะห์ความเป็นกรดด่างด้วยพีเอชมิเตอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง ต้องมีการเติมอาหาร T6, อาหาร T6 ที่มีแหล่งน้ำตาลจากยูคาลิปตัส และอาหารที่มีน้ำตาลจากยูคาลิปตัสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ในชุดควบคุม และชุดทดลอง ตามลำดับ โดยถ่ายอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อปรับปริมาตรของอาหารให้เท่าเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์

3.7.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (Proximate analysis)

3.7.1.1 ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำถ้วยอลูมิเนียมใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1) ทำการชั่งตัวอย่างที่ยูคาลิปตัสประมาณ 3 กรัม (W) ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนและบันทึกน้ำหนัก นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ เมื่อครบกำหนดเวลานำถ้วยอลูมิเนียมออกใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนัก (W_2) และทำการอบซ้ำอีกครั้ง 1 ชั่วโมง จนผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 3 มิลลิกรัม จากนั้นคำนวณหาปริมาณความชื้นดังนี้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(W_2-W_1)}{W} \times 100$$

เมื่อ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

3.7.1.2 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำขวดก้นกลมอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก (W_1) ชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัสที่บดละเอียดใส่กระดาษกรองประมาณ 1 กรัม (W) ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในทิมเบิ้ลใส่ในหลอดชุดเครื่องกลั่นวิเคราะห์ไขมัน (soxhlet) เทปิโตรเลียม อีเทอร์ใส่ขวดก้นกลมประมาณ 140 มิลลิลิตร แล้วประกอบเข้าชุดเครื่องกลั่นวิเคราะห์ไขมัน ใช้เวลากลั่นประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดก้นกลมไปทำการกลั่นระเหยปิโตรเลียม อีเทอร์ออกให้เหลือ 1 ใน 3 ของขวดก้นกลม จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อระเหยปิโตรเลียม อีเทอร์ เหลือแต่ไขมันที่สกัดได้ นำออกมาใส่โถดูดความชื้นรอจนเย็นจากนั้น นำขวดก้นกลมไปชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_2) จากนั้นคำนวณหาปริมาณไขมันดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{W_2-W_1}{W} \times 100$$

เมื่อ W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)

W_2 = น้ำหนักไขมันและน้ำหนักขวดก้นกลม (กรัม)

3.7.1.3 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

ชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัสประมาณ 1.5 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน เติมคะตะลิสต์ซึ่งเป็นส่วนผสมของ K_2SO_4 6.5 กรัม กับ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 กรัม ในลักษณะเม็ดลงไป 1 เม็ด และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนตัวอย่างเป็นสารละลายสีเขียวใส เมื่อสารละลายเย็นลงแล้ว ทำการเปิดเครื่องกลั่นตั้งค่าระบบการทำงานของเครื่อง โดยต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 และน้ำกลั่นเพื่อทำการกลั่น จากนั้นล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ระบบการทำงานของเครื่องกลั่น และวางขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ที่เป็นสารผสมระหว่างเมททิลเรด เมทิลีนบลูและโบรโมคลีซอลกรีน 3 หยด นำหลอดย่อยตัวอย่างประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น เป็นเวลา 4 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติซึ่งเป็นสารละลายสีชมพูอ่อน เทียบกับแบลงค์ที่มีขั้นตอนการเตรียมที่เหมือนตัวอย่างแต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times 0.1 \times 0.014}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} \times C$$

เมื่อ A = ปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตแบลงค์ (มิลลิลิตร)

C = conversion factor (มีค่าเท่ากับ 6.25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

ได้ทำการส่งตัวอย่างยูคาลิปตัสตรวจวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยมีรายละเอียดดังนี้

นำครูซิเบิ้ลแก้วสำหรับวิเคราะห์เยื่อใยไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและทิ้งให้เย็น นำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วใส่ลงไปในครูซิเบิ้ลที่ชั่งน้ำหนัก ประมาณ 1 กรัม (F_3) วางครูซิเบิ้ลแก้วลงในหลุมที่อยู่บนตัวเครื่องสกัดเส้นใย เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้วเทลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายออกล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์มอล ที่ทำให้ร้อนลงไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที กรองเอาสารละลายด่างออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยอะซิโตนอีกทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 225 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำครูซิเบิ้ลออกมาใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึก (F_1) จากนั้นนำกากที่ได้ไปอบต่อที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก (F_2) แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

การคำนวณ

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

เมื่อ F_1 = น้ำหนักของเยื่อใยหยาบและน้ำหนักเถ้า (กรัม)

F_2 = น้ำหนักเถ้า (กรัม)

F_3 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.1.5 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2004)

นำครูซิเบิ้ลอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นและชั่งน้ำหนัก ทำการชั่งตัวอย่างยูคาลิปตัสที่บดละเอียดประมาณ 1 กรัม ใส่ในครูซิเบิ้ลที่ทราบน้ำหนัก นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รออุณหภูมิลดจนเหลือต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้ถ้วยสัมผัสกับอากาศเย็นกะทันหันซึ่งอาจทาให้ถ้วยแตกได้ นำครูซิเบิ้ลออกใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นนำไปชั่งแล้วบันทึกน้ำหนัก แล้วคำนวณตามสมการ ดังนี้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักครูซิเบิ้ลพร้อมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักครูซิเบิ้ล})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.7.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = ปริมาณความชื้น–ปริมาณเถ้า–ปริมาณโปรตีน–ปริมาณกาก–ปริมาณไขมัน

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณลิกโนเซลลูโลส

ได้ส่งยูคาลิปตัสตรวจวิเคราะห์ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.7.2.1 การวิเคราะห์หา Acid Detergent Fiber (ADF)

นำครูซิเบิ้ลขนาด 50 มิลลิลิตร อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก (W_2) จากนั้นชั่งตัวอย่างแห้งที่บดละเอียดขนาด 300 ไมโครเมตร ใส่ในบีกเกอร์ปากกลมเรียบ แล้วนำสารละลาย Acid Detergent ไปต้มให้ร้อน ตวงใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร นำไปทำการย่อยหรือ reflux นาน 1 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย หลังจากนั้นทำการกรองโดยเทสารละลายในบีกเกอร์ลงครูซิเบิ้ลที่ชั่งน้ำหนักแล้วที่ติดกับเครื่องสุญญากาศ ล้างตัวอย่างที่อยู่ในบีกเกอร์ด้วยขวดฉีดน้ำร้อนจนกระทั่งตัวอย่างส่วนที่เหลือทั้งหมดลงในครูซิเบิ้ลจนหมด ล้างตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิ้ลจนหมดฟอง จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ลด้วยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อนอีก 1 – 2 ครั้ง โดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน จากนั้นดูดน้ำออกด้วย vacuum pump ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 8 ชั่วโมง นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้นจากนั้นปล่อยให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3) เพื่อทำการคำนวณหาค่าร้อยละ ADF จากนั้นนำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งและบันทึกน้ำหนักเถ้า (W_1) นำไปคำนวณหาค่าร้อยละ ADF

การคำนวณ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล

W_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

3.7.2.2 วิธีวิเคราะห์หา Acid Detergent Lignin (ADL)

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างที่วิเคราะห์หา ADF แล้วมาเติมสารละลายร้อยละ 72 H_2SO_4 ที่เย็น (20 องศาเซลเซียส) ลงไปประมาณครึ่งครูซิเบิ้ล จากนั้นนำไปวางลงในถาดสแตนเลส ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่ว เพื่อให้ตัวอย่างแยกออกจากกันไม่จับตัวเป็นก้อน โดยมีน้ำกลั่นที่อยู่ในถาดสแตนเลสระดับต่ำกว่าระดับของแผ่น Fritted glass รักษาอุณหภูมิของครูซิเบิ้ลในถาดสแตนเลสที่ 20 – 30 องศาเซลเซียส คอยเติมสารละลายร้อยละ 72 H_2SO_4 เมื่อสารละลายในครูซิเบิ้ลแห้ง คนเป็นระยะ ๆ ใช้เวลาย่อยนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปดูดเพื่อล้างสารละลายกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำร้อน จากนั้นใช้ขวดฉีดน้ำไล่ตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ลจนหมด แล้วฉีดล้างครูซิเบิ้ลอีกหนึ่งครั้ง นำครูซิเบิ้ลพร้อมตัวอย่างที่ย่อยแล้วนำไปอบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่โถดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก (W_4) เพื่อคำนวณหาปริมาณเซลลูโลสจากสูตรต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละของเซลลูโลส} = \frac{W_1\text{-}W_4}{W_3} \times 100$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนัก ADF

W_4 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ

W_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

3.7.2.3 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส

วิธีวิเคราะห์หา Neutral Detergent Fiber (NDF)

นำครูซิเบิ้ลขนาด 50 มิลลิลิตร อบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก (W_2) จากนั้นชั่งตัวอย่างที่แห้งบดละเอียดขนาด 300 ไมโครเมตร ใส่ในบีกเกอร์ปากกลมเรียบ (ใส่ Na_2SO_3 0.5 กรัมในตัวอย่างที่มีคิวตินสูง) แล้วนำสารละลาย Neutral Detergent Fiber ต้มให้ร้อนประมาณ 5 นาที เขย่าบีกเกอร์แล้วยกลง ทำการกรองโดยเทสารละลายในบีกเกอร์ลงครูซิเบิ้ลที่ชั่งน้ำหนักแล้วที่ติดกับเครื่องสุญญากาศ ล้างตัวอย่างที่อยู่ในบีกเกอร์ด้วยขวดฉีดน้ำร้อน จนกระทั่งตัวอย่างส่วนที่เหลือทั้งหมดลงในครูซิเบิ้ลจนหมด ล้างตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิ้ลจนหมดฟอง จากนั้นล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิ้ลด้วยน้ำร้อนอีก 1 – 2 ครั้งโดยใช้ขวดฉีดน้ำร้อน จากนั้นดูดน้ำออกด้วย vacuum pump ล้างตัวอย่างด้วยอะซิโตน 3 ครั้ง หรือจนกระทั่งสารละลายที่ไหลออกจากครูซิเบิ้ลไม่มีสี นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำครูซิเบิ้ลออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาค่า ADF จากนั้นนำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นแล้วปล่อยให้เย็น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก (W_1) แล้วคำนวณตามสมการ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

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

เมื่อ W_1 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล+น้ำหนักตัวอย่าง

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล

W_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

ร้อยละของเฮมิเซลลูโลส = ร้อยละของ NDF – ร้อยละของ ADF

3.7.2.4 ปริมาณลิกนิน

นำครูซิเบิ้ลที่มีตัวอย่างที่วิเคราะห์หาเซลลูโลสแล้ว (3.7.2.2) (W_4) นำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกใส่ในโถดูดความชื้น และทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักและบันทึกน้ำหนัก (W_5) หาลิกนินจากสมการต่อไปนี้

การคำนวณ

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

เมื่อ W_4 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนักเยื่อใยหลังการอบ

W_5 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล + น้ำหนักเยื่อใยหลังการเผา

W_3 = น้ำหนักตัวอย่าง

3.7.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.7.3.1 การวิเคราะห์ความขุ่นของอาหาร

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากการเพาะเลี้ยงในแต่ละครั้ง มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนในนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ ยี่ห้อ Mettler Toledo™ และวิเคราะห์ปริมาณบิวทานอล และสารอินทรีย์อื่น ๆ ส่วนตะกอนทำการ resuspend จากนั้นแบ่งปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ความขุ่นของอาหารด้วยเครื่อง Spectrophotpmeter ยี่ห้อ Thermo Scientific

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและตัวอย่างที่เก็บจากการเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid (DNS) ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละการเจือจางมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.7.3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักหลอดและนำตัวอย่างมาปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงไปและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีเซลล์อยู่ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหลอดและคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นหน่วยกรัมต่อลิตรตามสมการ ดังนี้

การคำนวณ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลังอบ - น้ำหนักก่อนอบ}}{5} \times 1000$$

3.7.3.4 การวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลหลังการย่อยยูคาลิปตัส

นำส่วนใสที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสมาเจือจาง 10 เท่า จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลกลูโคส มอนโตส ไซโลส และเซลโลไบโอส โดยใช้เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography ; HPLC) ใช้กลีเซอรอลร้อยละ 5 เป็น Internal standard กรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยทำการผสมกลีเซอรอล 0.5 มิลลิลิตร กับตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

คอลัมน์ Amines Fermentation Monitor ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส วัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงและฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้ว หาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.7.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล และสารอินทรีย์อื่น ๆ

นำส่วนใสที่ได้จากการเก็บตัวอย่างแต่ละชั่วโมงมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดซิตริก และกรดบิวทิริก โดยใช้เครื่อง HPLC ใช้สารละลายกรดซิตริกร้อยละ 2 สำหรับทำเป็น Internal standard กรองสารละลายตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมกรดซิตริกปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิตริก และกรดบิวทิริก โดยใช้คอลัมน์ Amines Fermentation Monitor ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงและฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้าแล้ว หาความเข้มข้นของสารต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำอย่างน้อย 3 ซ้ำและนำข้อมูลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้จากวิธี DNS ค่าพีเอช ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ตรวจได้จากเครื่อง HPLC มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 24) วิเคราะห์ตาราง ANOVA และค่าความแปรปรวนที่ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ $p < 0.05$ เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีของ Duncan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับสภาพยูคาลิปตัสให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปรับสภาพของยูคาลิปตัสและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 จากนั้นนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มาใช้ในการผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการหมักโดยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ และอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งได้จากการย่อยยูคาลิปตัส โดยเปรียบเทียบกับอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ค่าความขุ่นของอาหาร วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของยูคาลิปตัส

การวิเคราะห์องค์ประกอบของยูคาลิปตัส เริ่มจากการนำกิ่งยูคาลิปตัสมาปอกเปลือก อบด้วยลมร้อน และบดให้ละเอียด จากนั้นทำการวิเคราะห์ 6 องค์ประกอบ คือ ความชื้น (Moisture) เถ้า (Ash) ไขมันหยาบ (Crude fiber) โปรตีนหยาบ (Crude protein) เยื่อใยหยาบ (Crude fiber) และคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) ด้วยวิธีการทางเคมีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (2004) และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์ของ AOAC (2016) โดยผลการวิเคราะห์ที่ได้ทั้งหมด แสดงในตารางที่ 4.1

เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความชื้นของยูคาลิปตัสจาก ปรีชา พิศิษฎ์ และสันทัด (2537) ที่ได้เท่ากับร้อยละ 5.25 - 13.0 ซึ่งได้ค่าใกล้เคียงกันกับในตารางที่ 4.1 คือร้อยละ 6.49 และได้ปริมาณเถ้า 1.76 - 7.3 ใกล้เคียงกับผลการทดลองเช่นกัน นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างยูคาลิปตัสที่นำมาทำการทดลองมีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลสร้อยละ 56.23 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 15.98 และลิกนินร้อยละ 11.34 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Patt และคณะ (2006) ที่ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในต้นยูคาลิปตัส พบว่ามีองค์ประกอบที่คิดเป็นสัดส่วนร้อยละโดยน้ำหนักของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส 51.3 ลิกนินร้อยละ 21.9 และพบปริมาณเฮมิเซลลูโลสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนงานวิจัยของ Morais, Sansígolo และ Neto (2016) พบว่ามีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 39.98 และลิกนินร้อยละ 21.94 ในต้นยูคาลิปตัส ซึ่งผลการวิเคราะห์องค์ประกอบที่ได้อาจคลาดเคลื่อนเนื่องจากปริมาณเซลลูโลสในต้นพืชมีความแตกต่างตามอายุของต้นพืช การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์และสายพันธุ์ของพืช (สุชใจ, 2554)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของยูคาลิปตัสที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบ	ร้อยละ (ของน้ำหนักยูคาลิปตัสแห้ง)
ความชื้น	6.49
เถ้า	1.43
ไขมันหยาบ	6.35
โปรตีนหยาบ	0.06
เยื่อใยหยาบ	62.14
คาร์โบไฮเดรต	47.81
เซลลูโลส	56.23
เฮมิเซลลูโลส	15.98
ลิกนิน	11.34

หมายเหตุ: ความชื้น มีหน่วยเป็น ร้อยละของน้ำหนักยูคาลิปตัส

4.2 การปรับสภาพยูคาลิปตัส

การปรับสภาพวัตถุดิบมีจุดประสงค์เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิดหลัก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งลิกนินนั้นเปรียบเสมือนผนังป้องกันไม่ให้เอนไซม์เข้าไปย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปรับสภาพ (Pretreatment) และขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) เพื่อเป็นการทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสทำให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ สามารถเข้าถึงและย่อยวัสดุได้ง่ายมากขึ้น (รัชพล, 2558)

4.2.1 ผลของการปรับสภาพของยูคาลิปตัสด้วยกรดและเบส

เพื่อศึกษาผลของสารละลายกรดและเบสต่อการปรับสภาพยูคาลิปตัส ทำการทดลองโดยนำตัวอย่างยูคาลิปตัสที่แห้งแล้ว ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยใช้ตัวอย่าง 10 กรัมต่อสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร โดยปรับสภาพด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังปรับสภาพแล้วกรองแยกตะกอนไปอบให้แห้งเพื่อนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป ส่วนของเหลวที่กรองได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) แสดงผลในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 0.0 - 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

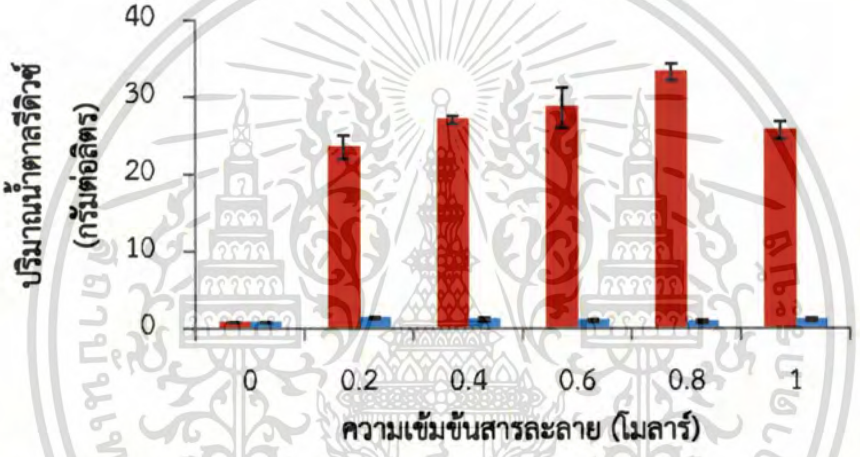
ความเข้มข้น (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัส (กรัมต่อลิตร)	
	สารละลายกรด (H_2SO_4)	สารละลายเบส (NaOH)
0.0 (น้ำกลั่น)	$0.821^{d} \pm 0.03$	
0.2	$23.52^{c} \pm 1.54$	$1.42^{a} \pm 0.11$
0.4	$27.09^{b} \pm 0.49$	$1.20^{ab} \pm 0.24$
0.6	$28.65^{b} \pm 2.60$	$1.04^{ab} \pm 0.19$
0.8	$33.21^{a} \pm 1.10$	$0.91^{b} \pm 0.19$
1.0	$25.71^{bc} \pm 1.10$	$1.16^{ab} \pm 0.23$

หมายเหตุ: a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการทดลอง ตารางที่ 4.2 พบว่าส่วนใสหลังการปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อใช้สารละลายกรดความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 33.21 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือส่วนใสหลังการปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเมื่อใช้สารละลายเบสความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีค่าเท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร และพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคือส่วนใสที่แยกได้หลักการปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แยกได้จากส่วนใสหลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น รูปที่ 4.1 พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกมีค่ามากกว่า สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ในทุกความเข้มข้นและมีปริมาณสูงสุด ซึ่งหมายความว่าตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดสูญเสียน้ำตาลรีดิวซ์ไปกับขั้นตอนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับสภาพมากที่สุด จากการศึกษาของ Olsson และ Hahn-Hägerdal (1996) พบว่าการใช้กรดเจือจางนั้นเป็นการใช้กระบวนการย่อยด้วยกรดแบบ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็นการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและขั้นที่สองเป็นการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งจะทำให้ได้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสตามลำดับ สำหรับการปรับสภาพด้วยด่างนั้นเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวจะทำให้เส้นใยพองตัว สลายโครงสร้างลิกนิน ทำลายพันธะระหว่างลิกนินที่เชื่อมกับคาร์โบไฮเดรต เป็นการทำลายโครงสร้างของลิกนิน และพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลส (Balat และคณะ, 2008) การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดแม้จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่ไม่นำมาศึกษาต่อเนื่องจากมีขั้นตอนการกำจัดสารพิษพวกอนุพันธ์ฟูเรนที่ซับซ้อนและใช้เวลานาน อีกทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมด้วย



รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใสที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 0.0 - 1.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (■ H_2SO_4, ■ NaOH)

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ส่วนใสหลังการปรับสภาพยูคาลิปตัสด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) แม้จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด แต่เมื่อนำตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 อัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่แยกได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.0 - 1.0 โมลาร์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่นำมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วนเดียวกัน จะเห็นว่ามีค่าสูงกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายกรดซัลฟิวริกในทุกเวลาและทุกความเข้มข้น โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 14.52 และ 13.16 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 และ 0.6 โมลาร์ ตามลำดับ แสดงผลในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

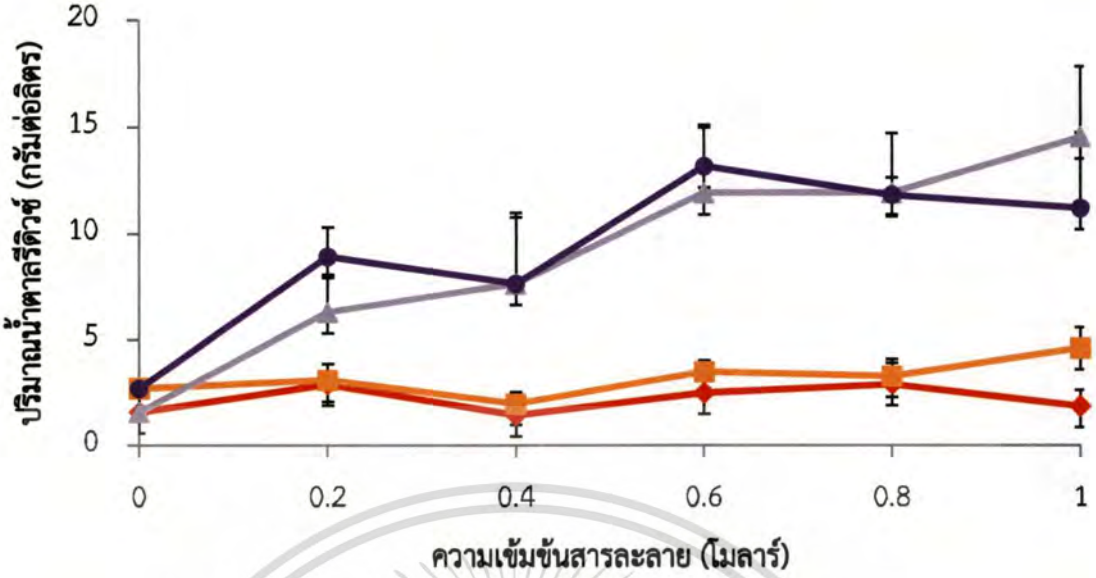
ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

อัตราส่วนเอนไซม์ (มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง)	ความเข้มข้นของ H_2SO_4 และ NaOH (โมลาร์)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนยูคาลิปตัส (กรัมต่อลิตร)			
		สารละลายกรด (H_2SO_4)		สารละลายเบส (NaOH)	
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0.5	0.0 (น้ำกลั่น)	$1.59^{b} \pm 0.12$	$2.72^{b} \pm 0.16$	$1.59^{b} \pm 0.12$	$2.72^{b} \pm 0.16$
	0.2	$2.91^{a} \pm 0.97$	$3.10^{a} \pm 0.38$	$6.31^{a} \pm 1.78$	$8.94^{a} \pm 1.37$
	0.4	$1.43^{b} \pm 0.38$	$1.98^{b} \pm 0.56$	$7.65^{b} \pm 3.13$	$7.66^{b} \pm 3.32$
	0.6	$2.50^{a} \pm 0.21$	$3.50^{a} \pm 0.53$	$11.91^{a} \pm 3.20$	$13.16^{a} \pm 1.80$
	0.8	$2.91^{a} \pm 1.17$	$3.28^{a} \pm 0.64$	$11.91^{a} \pm 2.81$	$11.81^{a} \pm 0.81$
	1.0	$1.87^{a} \pm 0.78$	$4.61^{a} \pm 0.97$	$14.52^{a} \pm 3.29$	$11.19^{a} \pm 3.53$

หมายเหตุ: a และ b ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนยูคาลิปตัสหลังผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.5 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (◆ สารละลาย H_2SO_4 ชั่วโมงที่ 24, ■ สารละลาย H_2SO_4 ชั่วโมงที่ 48, ▲ สารละลาย NaOH ชั่วโมงที่ 24,● สารละลาย NaOH ชั่วโมงที่ 48)

จากตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในทุกความเข้มข้นส่งผลต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ในส่วนของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สามารถย่อยยูคาลิปตัสได้ดีที่สุดคือ 1.0 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดถึง 14.52 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้ทำการทดลองเลือกใช้วิธีการปรับสภาพยูคาลิปตัสโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 11.91 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ นันทิกา, เพ็ญจิตรและอนุสิษฐ์ (2554) แสดงให้เห็นว่าผลการปรับสภาพชางข้าวฟ่างหวานด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าที่ความเข้มข้นต่างกันส่งผลให้องค์ประกอบชางข้าวฟ่างหวานต่างกันด้วย คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณของเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณของเฮมิเซลลูโลส และลิกนินลดลง เมื่อเปรียบเทียบชางข้าวฟ่างหวานที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าปริมาณของเซลลูโลสจะเพิ่มขึ้นเพียง 0.73 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ถ้าหากการปรับสภาพในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงหรือต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากเกินไป และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพมากหรือน้อยเกินไป (Han และคณะ, 2012; Chen และคณะ, 2013) จะมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ถึงแม้ว่าการปรับสภาพด้วยด่างที่ความเข้มข้นสูง อุณหภูมิสูงและระยะเวลานาน จะช่วยทำให้กำจัดลิกนินได้มากและช่วยในการย่อยได้ดี แต่ถ้าหากมากเกินไปจะทำให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสบางส่วนถูกทำลายจึงมีผลต่อความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงในกระบวนการไฮโดรไลซิส

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

หลังจากทำการปรับสภาพตัวอย่างยูคาลิปตัสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์นำตะกอนของ ยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ โดยนำตะกอนของยูคาลิปตัสที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 โดยใช้เอนไซม์ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 และ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.5 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 5 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเอนไซม์ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส ซึ่งเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ Endoglucanase 2500 U และเอนไซม์ Beta-Glucosidase 612.5 U) บ่มใน water bath ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนใสที่กรองได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) พบว่าปริมาตรเอนไซม์ที่ 0.45 มิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 16.64 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคือ 5.51 กรัมต่อลิตร ตารางที่ 4.4 รูปที่ 4.3 ในการทดลองผู้วิจัยได้เลือกใช้สภาสภาวะการย่อยสลายยูคาลิปตัสโดยใช้ปริมาตรเอนไซม์ที่ 0.4 มิลลิลิตร ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 15.53 กรัมต่อลิตร เนื่องจากผลที่แสดงในตารางที่ 4.4 ค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ปริมาตรเอนไซม์ 0.45 และ 0.5 มิลลิลิตร โดย ทิพวรรณ (2553) กล่าวถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ว่า ถ้ามีปริมาณเอนไซม์มากจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าเอนไซม์มากพอความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะไม่มีซับสเตรทเหลือพอที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยา และปริมาณซับสเตรทมีผลเช่นเดียวกันกับปริมาณของเอนไซม์คือถ้าเพิ่มซับสเตรทมากเกินไป ปฏิกิริยาจะไม่เกิดเร็วขึ้น เพราะปริมาณเอนไซม์ไม่เพียงพอ

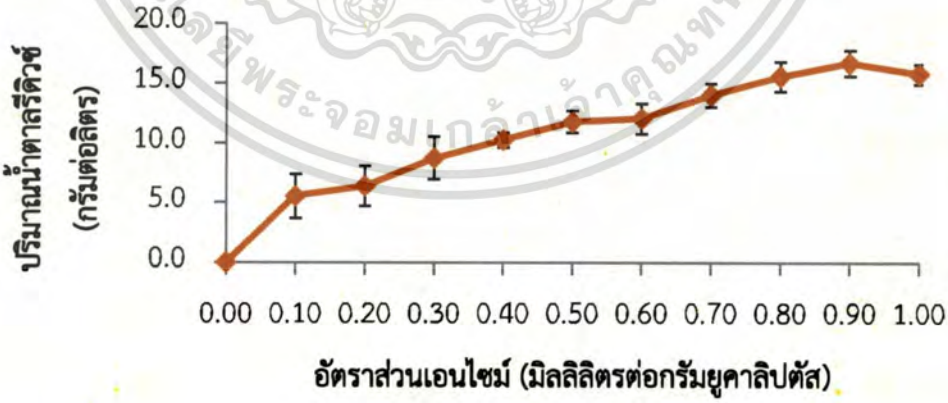
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

อัตราส่วนเอนไซม์ (มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0.10	$5.51^{f} \pm 1.85$
0.20	$6.39^{f} \pm 1.71$
0.30	$8.75^{e} \pm 1.80$
0.40	$10.26^{de} \pm 0.60$
0.50	$11.76^{cd} \pm 0.92$
0.60	$12.02^{cd} \pm 1.24$
0.70	$13.97^{bc} \pm 0.94$
0.80	$15.53^{ab} \pm 1.21$
0.90	$16.64^{a} \pm 1.07$
1.00	$15.72^{ab} \pm 0.84$

หมายเหตุ: a b c d e และ f ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 15000 ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาชนิดของน้ำตาลหลังการย่อยด้วยเอนไซม์

ทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่พบในยูคาลิปตัสหลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 โดยนำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็น Internal standard ได้ผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ในอัตราส่วน 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส

ชนิดน้ำตาล	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
กลูโคส	35.18 ± 1.18
ไซโลส	23.33 ± 3.10
มอลโตส	9.14 ± 0.33
เซลโลไบโอส	12.10 ± 0.22

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.5 พบว่ายูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์พบน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบคือ กลูโคสและไซโลสมีความเข้มข้นเท่ากับ 35.18 และ 23.33 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และน้ำตาลโมเลกุลคู่คือ มอลโตส และเซลโลไบโอสมีความเข้มข้นเท่ากับ 9.14 และ 12.10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในตารางที่ 4.1 ที่มีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 56.23 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 15.98 และลิกนินร้อยละ 11.34 นันทิกา และคณะ (2554) รายงานว่าการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยด่าง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จะทำให้ปริมาณของเซลลูโลสเพื่อขึ้นในขณะที่ปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินลดลง การย่อยเฮมิเซลลูโลสและลิกนินจึงไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียว แต่ต้องการการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่ใช้ในกระบวนการย่อยเป็นเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ Endoglucanase และเอนไซม์ Beta-Glucosidase (พิจิตรา, 2548) ซึ่งเอนไซม์ Endoglucanase จะเข้าทำปฏิกิริยาตรงส่วนของเซลลูโลสที่เป็น amorphous หรืออนุพันธุ์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลลูโลส โดยตัดที่ตำแหน่งพันธะ Beta-1,4-Glycosidic แบบสุ่มทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ เซลโลโอลิโก แซคคาไรด์ เซลโลเพนธาโอส เซลโลไตรโอส และกลูโคส รวมทั้งเซลโลไบโอส (cellobiose) หลังจากนั้นเอนไซม์ Beta-Glucosidase จะทำปฏิกิริยาย่อย cellobiose จนกระทั่งได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นสารอาหารแก่แบคทีเรียสำหรับนำไปใช้ในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ต่อไป

4.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10

โดยทั่วไปกระบวนการผลิต อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล จากแบคทีเรียตระกูล *Clostridium* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการผลิตกรด (Acidogenesis) และขั้นตอนที่สองเป็นการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenesis) เพื่อศึกษาคุณลักษณะการหมัก (Fermentation characteristic) ของ ยูคาลิปตัสในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในชุดควบคุม เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ กับอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งคาร์บอนจากยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย

ในกระบวนการหมัก ABE ผู้ทดลองเลือกใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากตะกอนของยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ และย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 โดยใช้ปริมาตรเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.5 กรัม (อัตราส่วนเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเจือจางส่วนใสที่ได้ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ T6 เป็นชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปหมักโดยใช้หัวเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้จากห้องปฏิบัติการ ร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยทำการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ทุกครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่างทำการเติมอาหารลงไปเท่ากับปริมาตรตัวอย่างที่เก็บ ตัวอย่างที่เก็บจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter ส่วนตะกอนนำไปหาค่าความชุ่นของอาหารและค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ด้วยอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ในตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ก) แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 0 มีค่าพีเอช 5.58 และมีแนวโน้มลดลงถึงระยะสุดท้ายของการหมักที่ชั่วโมง 168 คือ 4.80 เช่นเดียวกันกับค่าพีเอชในอาหารชุดทดลองจากตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ก) และ ตารางที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 รูปที่ 4.6 (ก) ที่มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะสุดท้ายของการหมัก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างกรดอินทรีย์

การศึกษาน้ำหนักเซลล์แห้ง ตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ข) พบว่าในชั่วโมงแรกมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นจนมีค่าเท่ากับ 2.23 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดในการทดลอง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 168 มีค่าเท่ากับ 0.55 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นชั่วโมงสุดท้ายของกระบวนการหมัก ในขณะที่การศึกษาความขุ่นของอาหาร พบว่าในชั่วโมงแรกมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.37 และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 72 คือ 3.09 ซึ่งจากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าชั่วโมงที่ 36 และ 48 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นค่าลดลงจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการทดลองคือ 1.48 ที่ชั่วโมง 168 เมื่อทำการเปรียบเทียบอาหารชุดทดลองทั้ง 2 ชุด กับอาหาร T6 ชุดควบคุม พบว่าในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ตารางที่ 4.7 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร และมีค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดเท่ากับ 1.00 ในชั่วโมงที่ 96 รูปที่ 4.5 (ข) ในขณะที่อาหารชุดทดลองที่ใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัส ตารางที่ 4.8 ในชั่วโมงที่ 48 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร และมีค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดเท่ากับ 0.365 ในชั่วโมงที่ 96 รูปที่ 4.6 (ข) ในกระบวนการหมัก ABE โดยใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส อาจมีสารยับยั้งการหมักหรือยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส เนื่องจากยูคาลิปตัสมีน้ำมันหอมระเหยทั้งในใบ ดอก ผล กิ่ง และก้าน ซึ่งส่วนประกอบและสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของยูคาลิปตัสจะมีส่วนประกอบทางเคมีและปริมาณสารไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่นำมาใช้ จากการศึกษาของ Ghalem และ Mohamed (2008) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยของยูคาลิปตัสสายพันธุ์ *Eucalyptus camaldulensis* และ *Eucalyptus globulus* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบอย่าง *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยปริมาณ 10 และ 50 ไมโครลิตร ในอาหารและบ่มนานประมาณ 2 หรือ 24 ชั่วโมง จะเห็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเกิดขึ้น ในขณะที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงถึง 100 ไมโครลิตร จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มทันทีภายใน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

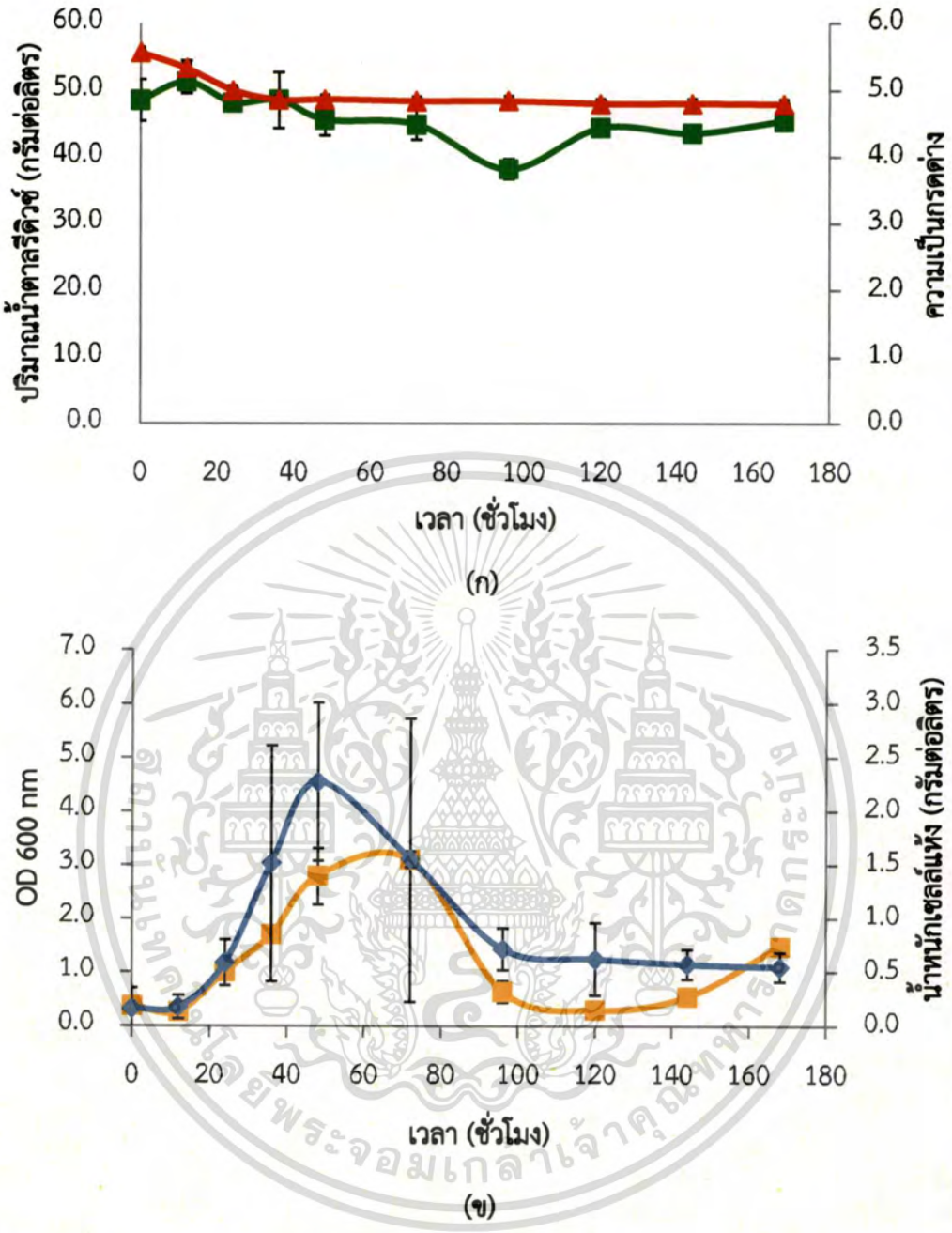
ตารางที่ 4.6 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	$5.58^{a} \pm 0.02$	$0.16^{b} \pm 0.19$	$0.37^{c} \pm 0.04$	$48.62^{ab} \pm 3.07$
12	$5.34^{b} \pm 0.11$	$0.17^{b} \pm 0.11$	$0.26^{c} \pm 0.14$	$51.38^{a} \pm 1.79$
24	$5.01^{c} \pm 0.03$	$0.59^{b} \pm 0.21$	$1.01^{c} \pm 0.07$	$48.24^{abc} \pm 0.46$
36	$4.86^{d} \pm 0.05$	$1.51^{a} \pm 1.10$	$1.70^{abc} \pm 0.04$	$48.64^{ab} \pm 4.20$
48	$4.87^{d} \pm 0.02$	$2.27^{a} \pm 0.74$	$2.79^{ab} \pm 0.53$	$45.69^{bcd} \pm 2.37$
72	$4.84^{d} \pm 0.04$	$1.55^{a} \pm 0.08$	$3.09^{a} \pm 2.65$	$44.93^{bcd} \pm 2.26$
96	$4.85^{d} \pm 0.02$	$0.71^{b} \pm 0.19$	$0.64^{c} \pm 0.21$	$38.24^{e} \pm 1.53$
120	$4.81^{d} \pm 0.05$	$0.62^{b} \pm 0.34$	$0.29^{c} \pm 0.01$	$44.45^{cd} \pm 0.78$
144	$4.81^{d} \pm 0.02$	$0.57^{b} \pm 0.14$	$0.54^{c} \pm 0.14$	$43.62^{d} \pm 0.61$
168	$4.80^{d} \pm 0.01$	$0.55^{b} \pm 0.13$	$1.48^{bc} \pm 0.08$	$45.43^{bcd} \pm 0.94$

หมายเหตุ: a b c d และ e ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร (■ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ▲ ความเป็นกรดด่าง, ◆ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ■ OD 600 nm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

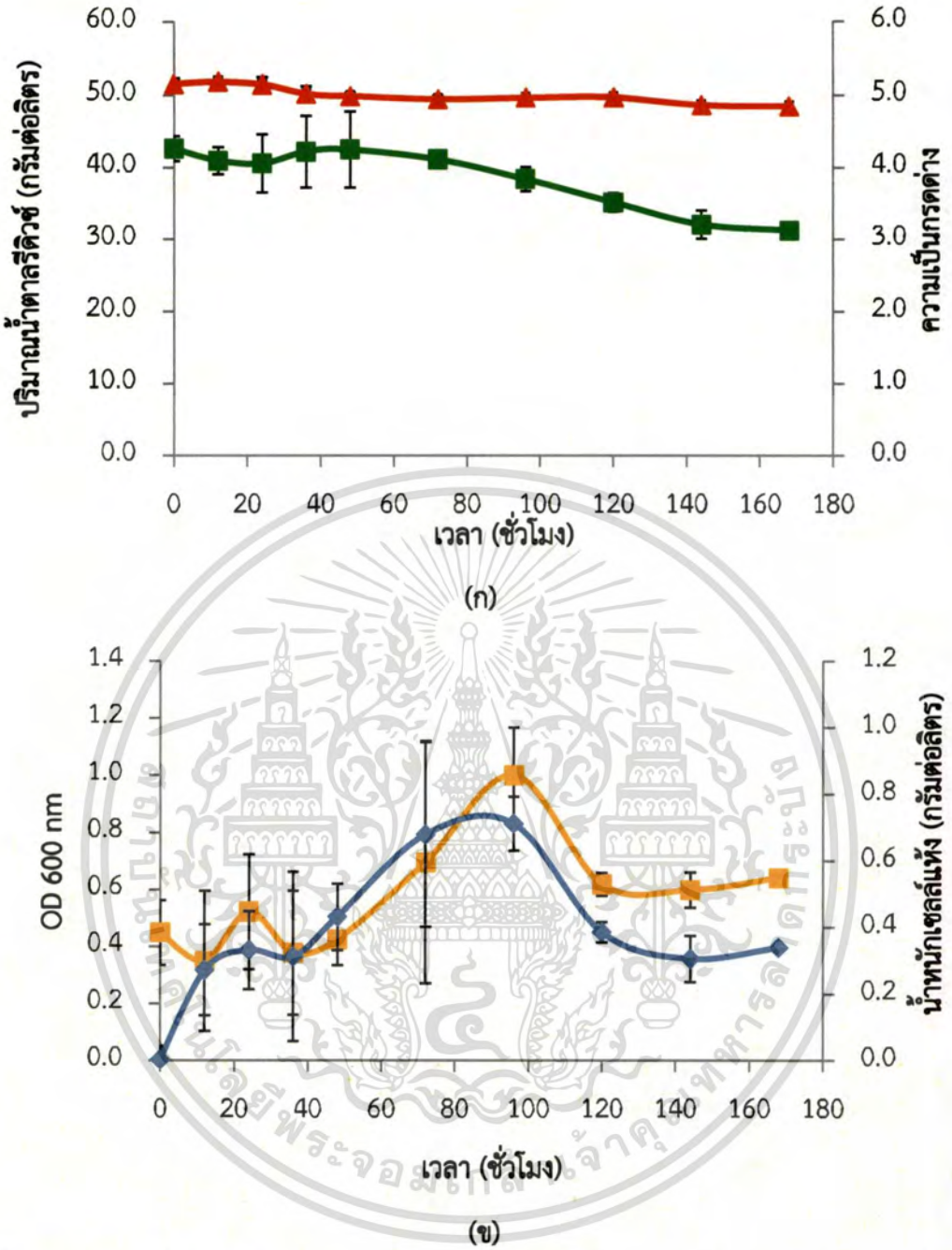
ตารางที่ 4.7 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความขุ่นของอาหาร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	$5.16^{a} \pm 0.05$	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.45^{b} \pm 0.23$	$42.62^{a} \pm 2.64$
12	$5.19^{a} \pm 0.08$	$0.27^{a} \pm 0.04$	$0.35^{b} \pm 0.11$	$40.95^{a} \pm 1.72$
24	$5.15^{a} \pm 0.02$	$0.33^{a} \pm 0.14$	$0.52^{b} \pm 0.25$	$40.60^{ab} \pm 1.88$
36	$5.02^{b} \pm 0.10$	$0.31^{a} \pm 0.12$	$0.38^{b} \pm 0.20$	$42.24^{a} \pm 3.99$
48	$4.99^{b} \pm 0.10$	$0.43^{a} \pm 0.25$	$0.43^{b} \pm 0.22$	$42.52^{a} \pm 4.97$
72	$4.95^{bcd} \pm 0.04$	$0.68^{a} \pm 0.10$	$0.70^{ab} \pm 0.09$	$41.17^{a} \pm 5.27$
96	$4.97^{bc} \pm 0.04$	$0.71^{a} \pm 0.28$	$1.00^{a} \pm 0.42$	$38.43^{ab} \pm 1.22$
120	$4.97^{bc} \pm 0.03$	$0.39^{a} \pm 0.08$	$0.62^{ab} \pm 0.17$	$35.19^{bc} \pm 1.66$
144	$4.86^{cd} \pm 0.03$	$0.31^{a} \pm 0.03$	$0.60^{b} \pm 0.04$	$32.10^{c} \pm 1.33$
168	$4.85^{d} \pm 0.03$	$0.34^{a} \pm 0.07$	$0.64^{ab} \pm 0.06$	$31.29^{c} \pm 1.97$

หมายเหตุ: a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร (■ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ▲ ความเป็นกรดด่าง, ◆ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ■ OD 600 nm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

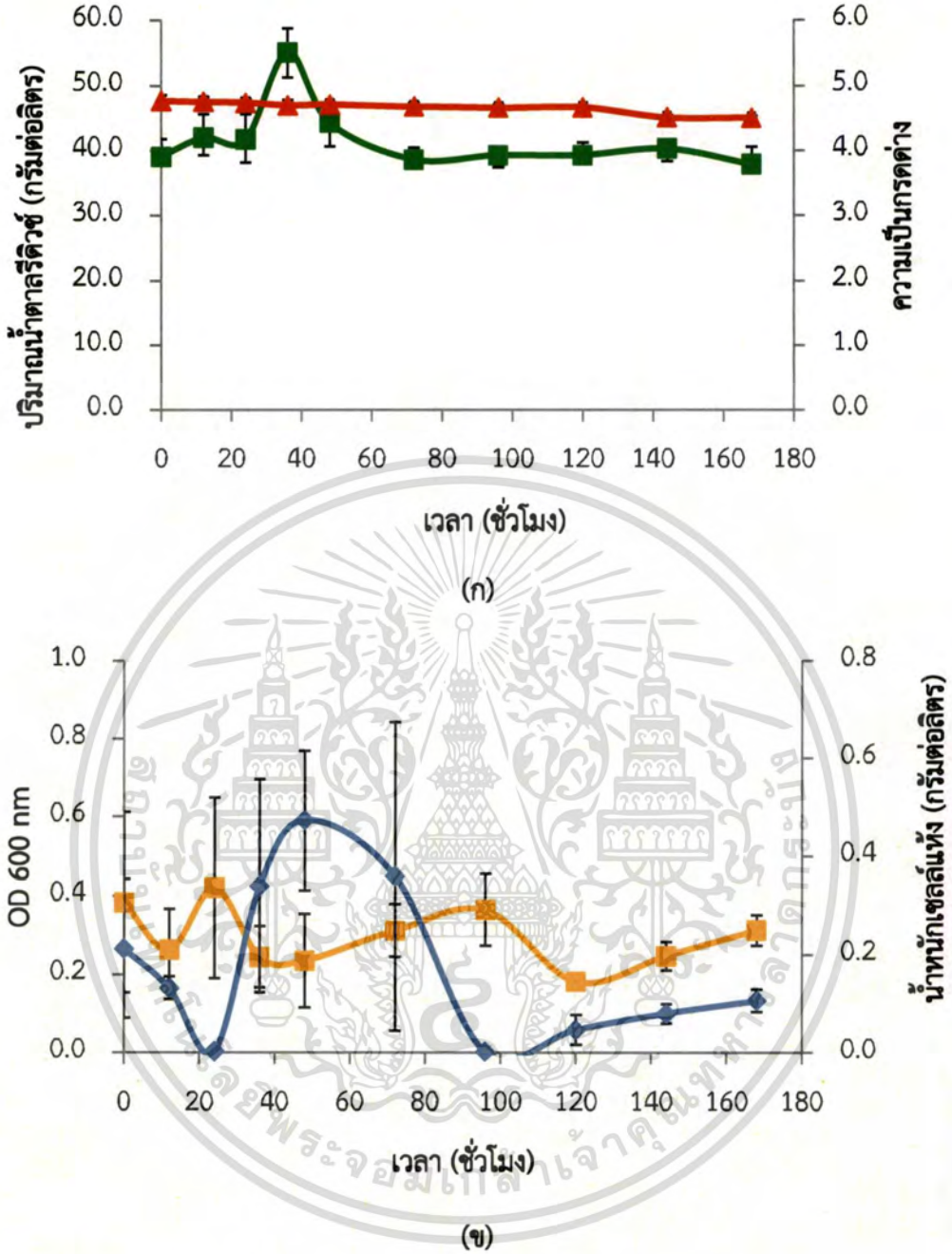
ตารางที่ 4.8 ค่า pH น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นเซลล์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
0	$4.77^{a} \pm 0.09$	$0.21^{a} \pm 0.14$	$0.38^{a} \pm 0.23$	$39.14^{c} \pm 2.67$
12	$4.75^{a} \pm 0.08$	$0.13^{a} \pm 0.02$	$0.26^{a} \pm 0.10$	$42.05^{bc} \pm 3.54$
24	$4.74^{a} \pm 0.06$	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.42^{a} \pm 0.23$	$41.76^{bc} \pm 3.86$
36	$4.70^{a} \pm 0.08$	$0.34^{a} \pm 0.22$	$0.25^{a} \pm 0.08$	$55.14^{a} \pm 3.66$
48	$4.71^{a} \pm 0.05$	$0.47^{a} \pm 0.14$	$0.24^{a} \pm 0.12$	$44.31^{b} \pm 1.26$
72	$4.68^{a} \pm 0.05$	$0.36^{a} \pm 0.31$	$0.31^{a} \pm 0.07$	$38.67^{c} \pm 1.86$
96	$4.66^{a} \pm 0.04$	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.37^{a} \pm 0.09$	$39.33^{c} \pm 0.16$
120	$4.66^{a} \pm 0.03$	$0.05^{a} \pm 0.03$	$0.18^{a} \pm 0.01$	$39.33^{c} \pm 1.94$
144	$4.51^{b} \pm 0.03$	$0.00^{a} \pm 0.02$	$0.25^{a} \pm 0.04$	$40.33^{bc} \pm 1.44$
168	$4.50^{b} \pm 0.03$	$0.11^{a} \pm 0.02$	$0.31^{a} \pm 0.04$	$37.93^{c} \pm 2.65$

หมายเหตุ: a b และ c ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง (ก) และค่าความขุ่นของอาหาร น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร (■ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์, ▲ ความเป็นกรดด่าง , ◆ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ ■ OD 600 nm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) ในอาหาร T6 ชุดควบคุม ตารางที่ 4.6 รูปที่ 4.4 (ก) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 48.62 กรัมต่อลิตร โดยมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการเติมอาหารใหม่ทุกครั้งหลังการเก็บตัวอย่าง ทำให้ที่ชั่วโมง 12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นถึง 51.38 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเล็กน้อยมีค่าเท่ากับ 48.24 กรัมต่อลิตร เนื่องจากแบคทีเรียนำไปใช้ในการสร้างสารผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 48.64 กรัมต่อลิตร และช่วงสุดท้ายของการทดลองที่ชั่วโมง 168 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเท่ากับ 45.43 กรัมต่อลิตร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติพบว่าค่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชุดทดลอง ตารางที่ 4.7 และ ตารางที่ 4.8 กับอาหาร T6 ชุดควบคุม (ตารางที่ 4.6) จะเห็นว่าอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ตารางที่ 4.7 รูปที่ 4.5 (ก) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 42.62 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะสุดท้ายของการหมักที่ชั่วโมง 168 มีค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 31.29 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของอาหารชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ตารางที่ 4.8 รูปที่ 4.6 (ก) ให้ผลในทิศทางเดียวกันกับอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส คือมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 39.14 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้ายเท่ากับ 37.93 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีการรายงานว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากยูคาลิปตัสมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Oussalah, Caillet และ Lacroix, 2006) ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบมีความทนทานกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อาจเป็นเพราะลักษณะที่แตกต่างกันของผนังเซลล์ ซึ่งแกรมลบประกอบด้วย lipoproteins และ lipopolysaccharide ทำให้การเข้าถึงเมมเบรนมีข้อจำกัด ซึ่งองค์ประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของน้ำมันหอมระเหยสามารถเข้าถึง periplasm ผ่าน porin protein ของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ผลของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกนั้นสามารถเทียบได้กับสารฆ่าเชื้อ โดยการทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและทำลายโครงสร้างเมมเบรนทำให้เกิดการรั่วไหลของ cytoplasmic เกิดการสลายเซลล์และการตายของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
0	N/A	$0.69^{e} \pm 0.05$	N/A	N/A	$0.26^{d} \pm 0.04$
12	$0.06^{b} \pm 0.00$	$0.61^{e} \pm 0.15$	$0.95^{bc} \pm 0.13$	N/A	$0.35^{d} \pm 0.13$
24	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.95^{d} \pm 0.13$	$0.80^{c} \pm 0.10$	$1.47^{c} \pm 0.13$	$2.11^{c} \pm 0.26$
36	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.58^{a} \pm 0.11$	$0.97^{bc} \pm 0.01$	$1.46^{c} \pm 0.02$	$3.10^{ab} \pm 0.15$
48	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.53^{a} \pm 0.12$	$0.85^{bc} \pm 0.08$	$1.38^{c} \pm 0.13$	$3.02^{ab} \pm 0.35$
72	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.53^{a} \pm 0.08$	$0.76^{c} \pm 0.02$	$1.47^{c} \pm 0.07$	$3.15^{a} \pm 0.14$
96	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.35^{ab} \pm 0.18$	$0.84^{bc} \pm 0.03$	$1.50^{c} \pm 0.04$	$2.80^{ab} \pm 0.35$
120	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.23^{bc} \pm 0.16$	$0.83^{c} \pm 0.06$	$1.40^{c} \pm 0.10$	$2.58^{bc} \pm 0.35$
144	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.26^{bc} \pm 0.20$	$1.06^{b} \pm 0.03$	$1.59^{bc} \pm 0.12$	$2.89^{ab} \pm 0.27$
168	$0.00^{b} \pm 0.00$	$1.02^{dc} \pm 0.36$	$0.78^{c} \pm 0.13$	$1.48^{c} \pm 0.19$	$2.26^{c} \pm 0.48$

หมายเหตุ: a b c d และ e ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
0	$0.04^{a} \pm 0.07$	$0.32^{a} \pm 0.10$	$0.96^{a} \pm 0.12$	$2.71^{a} \pm 0.38$	$0.38^{d} \pm 0.20$
12	$0.22^{a} \pm 0.38$	$0.44^{a} \pm 0.18$	$0.52^{b} \pm 0.45$	$2.24^{a} \pm 0.21$	$0.07^{d} \pm 0.03$
24	$0.06^{a} \pm 0.07$	$0.38^{a} \pm 0.16$	$0.71^{ab} \pm 0.05$	$2.48^{a} \pm 0.21$	$0.25^{d} \pm 0.06$
36	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.36^{a} \pm 0.19$	$0.69^{ab} \pm 0.07$	$2.69^{a} \pm 0.22$	$0.88^{c} \pm 0.47$
48	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.36^{a} \pm 0.10$	$0.66^{ab} \pm 0.12$	$2.60^{a} \pm 0.40$	$1.22^{bc} \pm 0.37$
72	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.30^{a} \pm 0.09$	$0.55^{b} \pm 0.10$	$2.49^{a} \pm 0.45$	$1.38^{ab} \pm 0.20$
96	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.42^{a} \pm 0.05$	$0.63^{b} \pm 0.09$	$2.60^{a} \pm 0.48$	$1.76^{a} \pm 0.29$
120	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.40^{a} \pm 0.07$	$0.69^{ab} \pm 0.02$	$2.75^{a} \pm 0.10$	$1.75^{a} \pm 0.13$
144	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.37^{a} \pm 0.03$	$0.77^{ab} \pm 0.14$	$2.88^{a} \pm 0.57$	$1.78^{a} \pm 0.37$
168	$0.00^{a} \pm 0.00$	$0.32^{a} \pm 0.08$	$0.62^{b} \pm 0.11$	$2.67^{a} \pm 0.48$	$1.47^{ab} \pm 0.21$

หมายเหตุ: a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

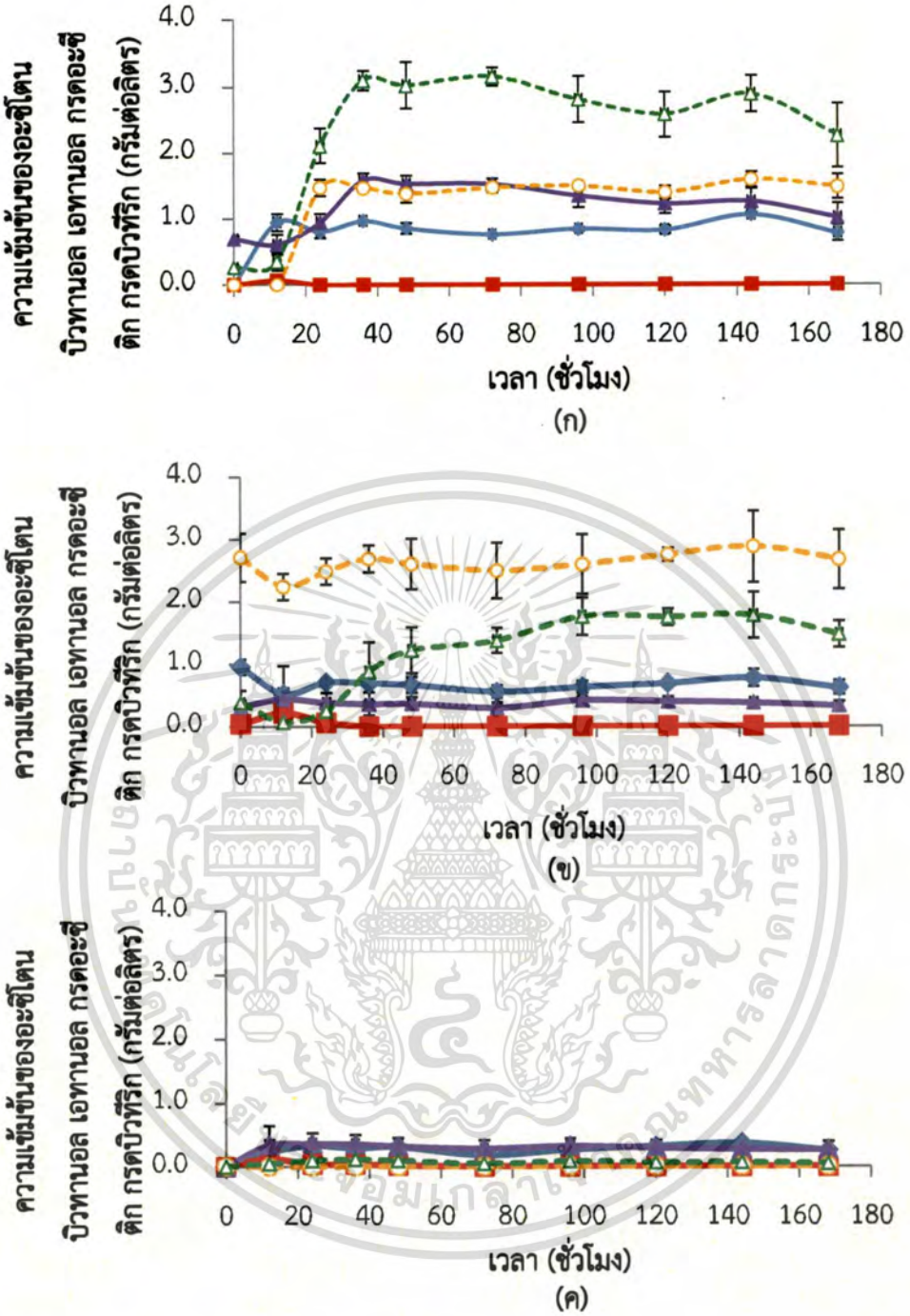
ตารางที่ 4.11 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
12	$0.12^{ab} \pm 0.21$	$0.34^{a} \pm 0.30$	$0.23^{bc} \pm 0.20$	N/A	$0.05^{b} \pm 0.02$
24	$0.04^{b} \pm 0.04$	$0.36^{a} \pm 0.17$	$0.33^{b} \pm 0.05$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.09^{b} \pm 0.05$
36	$0.04^{b} \pm 0.04$	$0.35^{a} \pm 0.14$	$0.29^{bc} \pm 0.02$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.11^{ab} \pm 0.05$
48	$0.02^{b} \pm 0.03$	$0.32^{a} \pm 0.13$	$0.31^{bc} \pm 0.06$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.09^{b} \pm 0.04$
72	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.28^{a} \pm 0.13$	$0.18^{c} \pm 0.04$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.04^{b} \pm 0.06$
96	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.32^{a} \pm 0.13$	$0.26^{bc} \pm 0.03$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.08^{b} \pm 0.07$
120	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.29^{a} \pm 0.12$	$0.32^{bc} \pm 0.01$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.06^{b} \pm 0.06$
144	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.27^{a} \pm 0.12$	$0.37^{b} \pm 0.06$	N/A	$0.06^{b} \pm 0.05$
168	$0.00^{b} \pm 0.00$	$0.26^{a} \pm 0.13$	$0.25^{bc} \pm 0.06$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.04^{b} \pm 0.05$

หมายเหตุ: a b c และ d ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

N/A คือไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้



รูปที่ 4.7 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ที่วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ใน (ก) อาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, (ข) อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส (ค) อาหารชุดทดลองที่เป็น ยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย ทั้งหมดมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร (—■— อะซิโตน, —▲— บิวทานอล, —◆— เอทานอล, --○-- กรดอะซิติก และ --△-- กรดบิวทิริก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณผลผลิตสารอินทรีย์จากกระบวนการหมัก โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เชื้อ *Clostridium* sp. G10 ผลิตคือ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก อะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล ผลการทดลองในตารางที่ 4.9 ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นกลูโคส ตรวจพบปริมาณของเอทานอล กรดอะซิติก และ กรดบิวทิริก สูงสุดชั่วโมงที่ 144, 144 และ 72 มีค่าเป็น 1.06, 1.59 และ 3.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และตรวจพบบิวทานอลสูงสุดชั่วโมงที่ 36 มีปริมาณ 1.58 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ไม่พบปริมาณอะซิโตนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 รูปที่ 4.7 (ก) ซึ่งในชุดควบคุมมีการผลิตตัวทำละลายและกรดอินทรีย์สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร T6 ที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอน ตารางที่ 4.10 พบว่ามีปริมาณของเอทานอลสูงสุดชั่วโมงที่ 144 คือ 0.77 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดที่ชั่วโมง 144 คือ 2.88 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดบิวทิริกสูงสุดที่ชั่วโมง 144 คือ 1.78 กรัมต่อลิตร ขณะที่อะซิโตนในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณสูงสุดคือ 0.22 กรัมต่อลิตร ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ชั่วโมงเริ่มต้น ส่วนปริมาณบิวทานอลพบว่าชั่วโมงที่ 12 มีค่าสูงสุดคือ 0.44 กรัมต่อลิตร ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ และมีแนวโน้มที่ลดลงจนถึงระยะสุดท้ายของการหมัก รูปที่ 4.7 (ข) ในขณะอาหารที่ใช้สารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ตารางที่ 4.11 จะเห็นว่าจากการวิเคราะห์ไม่พบปริมาณกรดอะซิติก แต่พบปริมาณกรดบิวทิริกสูงสุดชั่วโมงที่ 36 มีค่าเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตร และยังพบ เอทานอลมีปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมง 144 คือ 0.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีปริมาณบิวทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มที่ลดลงจนถึงระยะสุดท้ายของการหมัก โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในทำนองเดียวกันพบว่าปริมาณอะซิโตนชั่วโมงที่ 12 มีค่าสูงสุดคือ 0.12 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องจนไม่สามารถตรวจพบได้ รูปที่ 4.7 (ค) จากที่กล่าวไว้ข้างต้นน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากยูคาลิปตัสพบว่ามีสาร 1,8-cineole (Eucalyptol) สูงกว่า 70% (นันทิยา, 2549) ซึ่งสาร Eucalyptol เป็นสารประกอบ monoterpene และยังพบสารอื่น ๆ อีกเช่น α-pinene, β-phellandrene, ρ-cymen, citronellal, citronellol, citronellyl acetate, eucamalol, limonene, linalool, terpinen-4-ol, inalool, cuminaldehyde, spathulenol linalyl acetate ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพและยังสามารถใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการปรับสภาพและการย่อยสลายยูคาลิปตัสเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จะเห็นว่าในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลเกิดขึ้นและให้ปริมาณการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งหมดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ใช้สารที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ มีการผลิตบิวทานอล เอทานอล เกิดขึ้นแต่พบในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น และไม่พบการผลิตอะซิโตน แสดงผลดังตารางที่ 4.12 รูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.12 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหารในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสซึ่งผ่านการย่อย โดยมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร

การวิเคราะห์	อาหาร	ปริมาณสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
อะซิโตน	T6	0.06 ± 0.00
	T6 + Hydrolysate	0.00 ± 0.00
	Hydrolysate	0.00 ± 0.00
บิวทานอล	T6	1.58 ± 0.08
	T6 + Hydrolysate	0.44 ± 0.18
	Hydrolysate	0.36 ± 0.17
เอทานอล	T6	1.06 ± 0.03
	T6 + Hydrolysate	0.77 ± 0.14
	Hydrolysate	0.37 ± 0.06

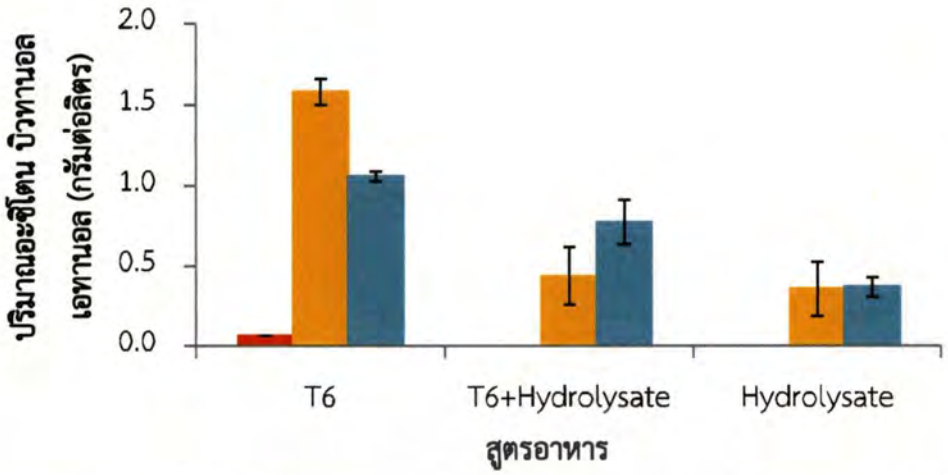
หมายเหตุ: ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

T6 คือ อาหารชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

T6 + hydrolysate คือ อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

Hydrolysate คือ อาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล วิเคราะห์ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส, อาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสซึ่งผ่านการย่อย โดยมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน, บิวทานอล และ เอทานอล)

โดยการทดลองของ Mcneil และ Kristiansen, (1985) พบว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญ และการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในการหมักแบบกะของ *Clostridium acetobutylicum* คือ ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม (Total solvent yield) มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพราะการลดลงของการผลิตอะซิโตน และพบว่าบิวทานอลจะไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิในรูปของผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวมและอัตราการผลิต ทั้งนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ 35 องศาเซลเซียส และจากงานวิจัยของสุนทร และ อภิชัย (2555) แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการหมักวัตถุดิบประเภทแป้งของแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* sp. ที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมักแป้งที่ พีเอช 5.5 เชื้อมีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวมสูงสุด 20.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งการทดลองที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายอินทรีย์สูงกว่าที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 1.5 เท่า ทั้งนี้ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักให้คงที่ในระหว่างกระบวนการหมัก มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจากการศึกษาทำให้คาดการณ์ได้ว่าในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 เชื้อสามารถดึงเอาน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัสไปใช้ได้ แต่เนื่องจากการใช้อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างในอาหาร รวมถึงสารหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทำให้กระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับสภาพยูคาลิปตัสให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ในห้องปฏิบัติการ จากการวิเคราะห์สารประกอบหลักในกิ่งยูคาลิปตัส พบว่ามีความชื้นร้อยละ 6.49 ปริมาณเถ้าทั้งหมดร้อยละ 1.43 ปริมาณไขมันหยาบร้อยละ 6.35 ปริมาณโปรตีนหยาบร้อยละ 0.06 ปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 62.14 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 47.81 ในส่วนขององค์ประกอบลิกโนเซลลูโลส พบว่ามีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 56.23 ปริมาณเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 15.98 และปริมาณลิกนินร้อยละ 11.34

สำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก เริ่มต้นด้วยการปรับสภาพยูคาลิปตัสให้เหมาะสมต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส โดยทำการปรับสภาพตัวอย่างยูคาลิปตัสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งหลังการปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 11.91 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อย โดยการเปรียบเทียบระหว่างเวลากับปริมาณของเอนไซม์ต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ ในการทดลองใช้เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตรเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.5 กรัม (อัตราส่วนเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตรต่อกรัมยูคาลิปตัส) ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ 15.53 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลหลังย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) พบน้ำตาลกลูโคส, ไซโลส, มอลโตส และเซลโลไบโอส แสดงให้เห็นว่า การปรับสภาพตัวอย่างยูคาลิปตัสแล้วย่อยด้วยเอนไซม์โนโครงงานวิจัยนี้ทำให้วัสดุกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ แต่ที่พบน้ำตาลไซโลส และมอลโทสอาจเนื่องมาจากขั้นตอนการปรับสภาพส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสยังถูกย่อยออกมาอีกด้วย ซึ่งเวลา ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณเอนไซม์ และปริมาณตัวอย่าง มีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 โดยใช้สูตรอาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส และอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย โดยปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 50 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจนและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง และเติมอาหาร T6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกครั้งหลังการเก็บตัวอย่าง พบว่าค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักมีค่าอยู่ในช่วง 4.5 - 5.6 ในอาหารที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อย ยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากันทั้ง 2 ชุดทดลอง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอาหารชุดควบคุมมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยน้ำหนักเซลล์แห้งและความขุ่นของอาหาร พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์และความขุ่นของอาหาร ในอาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสมีค่าค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 โดยน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 0.71 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดเท่ากับ 1.00 ในชั่วโมงที่ 96 ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่อาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นของอาหารเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร ค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 คือ 0.42 กรัมต่อลิตร โดยค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสูตรอาหารชุดควบคุม พบว่าอาหาร T6 ที่ใช้สารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัสมีความสอดคล้องกัน เนื่องจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของอาหารในชุดควบคุมค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24, 36, 48 และ 72 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 2.27 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 และมีค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดในชั่วโมงที่ 72 คือ 3.09 ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ผลปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) พบว่าเชื้อนำน้ำตาลไปใช้อย่างต่อเนื่องโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลลดลงตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 48.643 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 0 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่ 168 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 45.43 กรัมต่อลิตร ในทำนองเดียวกันปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหารชุดทดลองทั้ง 2 ชุด ที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัส มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 42.62 และ 39.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้มีแนวโน้มลดลงจนสิ้นสุดระยะเวลาการหมักชั่วโมงที่ 168 มีค่าเท่ากับ 31.29 และ 37.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ในอาหาร T6 ชุดควบคุมมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 144 มีค่าเท่ากับ 1.59 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดบิวทิริกสูงสุดชั่วโมงที่ 72 คือ 3.15 กรัมต่อลิตร ปริมาณอะซิโตนสูงสุดที่ในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นไม่พบการผลิตจนถึงระยะสุดท้ายของการหมัก บิวทานอลสูงสุดที่ชั่วโมง 36 ได้ 1.58 กรัมต่อลิตร และเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมง 144 ได้ 1.06 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส พบการผลิตกรดอะซิติกปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 ได้เท่ากับ 2.88 กรัมต่อลิตร กรดบิวทิริกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 ได้ 1.78 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมง 12 ได้เท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร เอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 เท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร และอะซิโตนสูงสุดที่ชั่วโมง 12 เท่ากับ 0.22 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ไม่พบการผลิตอะซิโตน ส่วนอาหารชุดทดลองที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย มีปริมาณกรดบิวทิริกสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ได้ 0.11 กรัมต่อลิตร อะซิโตนสูงสุดที่ชั่วโมง 12 เท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร บิวทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมง 24 ได้เท่ากับ 0.36 กรัมต่อลิตร และเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 เท่ากับ 0.37 กรัมต่อลิตร แต่ไม่พบการผลิตกรดอะซิติก เมื่อทำการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* sp. G10 สามารถผลิตได้ในอาหารชุดควบคุมและอาหารชุดทดลองทั้ง 2 ชุด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตและสามารถวิเคราะห์ออกมาได้คือ กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก แล้วยังผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งอาหารที่ใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์แทนแหล่งคาร์บอนอย่างน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตตัวทำละลายได้ แต่ได้ปริมาณที่น้อยกว่าอาหาร T6 ชุดควบคุม ดังนั้นการใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส อาจมีสารยับยั้งการหมักหรือยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส เนื่องจากยูคาลิปตัสมีน้ำมันหอมระเหยทั้งในใบ ดอก ผล กิ่ง และก้าน ซึ่งส่วนประกอบและสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของยูคาลิปตัสจะมีส่วนประกอบทางเคมีและปริมาณสารไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่นำมาใช้ ซึ่งคาดการณ์ได้ว่าการเพาะเลี้ยง *Clostridium* sp. G10 ในงานทดลองนี้ การใช้สารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยยูคาลิปตัสส่วนกิ่งเชื้อสามารถดึงเอานำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายยูคาลิปตัสไปใช้ได้ แต่เนื่องจากมีสารหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้กระบวนการหมักเพื่อการผลิตกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพยูคาลิปตัสและการย่อยด้วยเอนไซม์ อาจทำให้น้ำตาลเริ่มต้นมีความเข้มข้นขึ้นจากเดิม หรือการเพิ่มอัตราส่วนปริมาณเอนไซม์ให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อย และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้สูงขึ้น
2. ศึกษาสภาวะในการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักในระยะเวลาต่าง ๆ ของการเจริญของเชื้อ *Clostridium* sp. ทั้งระยะการสร้างกรด และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์
3. อาจเลือกใช้เชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์อื่น ๆ แทน ในกระบวนการหมัก ABE เช่น *C. acetobutylicum* DSM 792, *C. acetobutylicum* ATCC 824 หรือ *C. beijerinkii* นอกจาก *Clostridium* sp. G10 ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้
4. เปลี่ยนวิธีการปรับสภาพยูคาลิปตัสจากการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นวิธีอื่นแทน เพื่อเพิ่มผลผลิตของการผลิต ABE เช่น วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ การใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง
5. การวิจัยในครั้งนี้ เลือกวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร คือกิ่งยูคาลิปตัส หากต้องการทำการวิจัยเพื่อต่อยอด อาจเลือกส่วนอื่น เช่น ใบ หรือ เปลือก และศึกษาการปรับสภาพที่เหมาะสมต่อยูคาปตัสโดยเฉพาะ หรือการเลือกยูคาลิปตัสที่ปรับสภาพได้ดีกว่า เช่น การเลือกส่วนกิ่งยูคาลิปตัสที่มีอายุที่เหมาะสม การเลือกขนาดของกิ่งอย่างชัดเจน และเพิ่มขั้นตอนการกำจัดสารหอมระเหยที่เป็นตัวยับยั้งการหมักจากยูคาลิปตัส เพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรกนก โภยนอก และ วนิดา หยั่งบุญ. 2558. **ผลของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ต่อการต้านออกซิเดชั่นและผลทางชีวภาพของปลวก (*Odontotermes takensis*).** ปัญหาพิเศษทางชีววิทยา ครุศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.

กรมวิชาการเกษตร. 2554. **หนังสือรับรองพันธุ์พืชขึ้นทะเบียน**. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก http://www.doa.go.th/pvp/images/stories/indexpp2518/AnnoDOA/annodoa_publicno.61.pdf (วันที่สืบค้นข้อมูล: 9 มีนาคม 2561).

จันทรัสม์ โคมเวียน และ ชมภูนุช กลิ่นวงษ์. 2559. **แหล่งคาร์บอนจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตเอทานอลและบิวทานอลด้วยแบคทีเรียคลอสทริเดียม**. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 21(1): 64-77.

ชัชนันท์ นิวาสวงษ์ และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2555. **การผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลในประเทศไทย**. วารสารวิทยาศาสตร์, 40(4): 1073-1088.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุฌานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. **ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล**. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, 22(3): 703-709.

ธีรศักดิ์ ชนิดนอก, พีระยศ แข็งขัน และฤชุอร วรรณะ. 2557. **ประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaladulesis* Dehnh) ต่อการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero)**. แก่นเกษตร, 42(พิเศษ 1): 506-511.

ทิพวรรณ แตงสวน. 2553. **การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร**. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

นันทิกา คล้ายชม, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และอนุสิษฐ์ ธนะพิมพ์เมธา. 2554. **การผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากชางข้าวฟ่างหวานโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด**. วารสารวิศวกรรมสาร มก, 24(75): 91-102.

นันทิยา จิตธรรมมา. 2549. **ประสิทธิภาพในการเป็นสารกำจัดแมลงของน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) ต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* Fabricius)**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชากีฏวิทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริษัท โกลบอล เคมี่ เทรดดิ้ง จำกัด. 2009. เอ็น-บิวธานอล : N-Butanol (NBA). [ออนไลน์]. สืบค้นจาก http://www.gctcl.com/sites/default/files/n-Butanol.pdf (สืบค้นวันที่ 17 กันยายน 2560)

ปิยะนุช เปียคง. 2557. **การศึกษาการผลิตไซโลสจากทะลายปาล์มเปล่า**. วิทยานิพนธ์ วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปรีชา เกียรติกระจาย, พิศิษฎ์ เหล่าไทย และสันทัด แสงกุล. 2537. **ถ่านอัดก้อนจากไม้ ยูคาลิปตัส**. วารสารวนศาสตร์, 13(1): 38-49.

ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2548. **ประวัติความเป็น มายูคาลิปตัส**, ในการปลูกและดูแลรักษายูคาลิปตัส, เฉลิมทศพล เจริญสุข (บก.), บริษัท สำนักพิมพ์ เพชรกะรัต จำกัด, กรุงเทพฯ, 17-18.

มนตรี สนิทประชากร, สมศักดิ์ มนัสศรีสุขใส และสัมฤทธิ์ กิตติธรกุล. 2529. **การปลูกไม้ยูคาลิปตัสในประเทศไทย**. เอกสารส่งเสริมการปลูกป่าภาคเอกชน สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่าภาคเอกชน กรมป่าไม. กรุงเทพฯ.

สำนักงานเมดไทย. 2017. **ยูคาลิปตัส สรรพคุณและประโยชน์ของต้นยูคาลิปตัส 15 ข้อ**. [ออนไลน์]. สืบค้น จาก https://medthai.com/ยูคาลิปตัส. (วันที่สืบค้น 17 กันยายน 2560).

รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2558. **กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส**. Veridian E-Journal, 2(1): 143-157.

วนิดา ปานอุทัย, นิคม แหลมสัก, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2553. **การผลิตเอทานอลจากไม้ยูคาลิปตัสโดยกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาล และหมักพร้อมกัน. ใน** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 392 - 400.

สุขใจ ชูจันทร์. 2554. **การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุนทร กาญจนทวี และอภิชัย สาวิสิทธิ์. 2555. **การศึกษาการผลิตแอซิโตน บิวทานอล เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมัก**. รายงานการวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สูไฮลา สาและ. 2559. **การผลิตไบโอบิวทานอลจากสาหร่าย *Rhizoclonium* sp. ด้วยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเคมีประยุกต์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Amiri, H. and Karimi, K.. 2015. **Autohydrolysis: A promising pretreatment for the improvement of acetone, butanol, and ethanol production from woody materials**. Chemical Engineering Science, 137: 722-729.

Amiri, H. and Karimi, K.. 2016. **Integration of autohydrolysis and organosolv delignification for efficient acetone, butanol, and ethanol production and lignin recovery**. Industrial & Engineering Chemistry Research, 55: 4836-4845.

AOAC. 2004. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 11th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc., Washington DC.

Bajpai P. 2016. **Structure of Lignocellulosic Biomass**. In: Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. Springer-Briefs in Molecular Science. Springer, Singapore

Balat, M., Balat, H., and Öz, C. 2008. **Progress in bioethanol processing**. Progress in Energy and Combustion Science, 34: 551-573.

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

Chang, V.S. and Holtzapple, M.T.. 2000. **Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84(1-9): 5-37.

Chen, Y., Stevens M.A., Zhu, Y., Holmes, J. and Xu, H. 2013. **Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification**. Biotechnology for Biofuels, 6(8): 1-10.

Cho, D.H., Shin, S.J., Sang, B.I., Eom, M.O. and Kim, Y.H.. 2013. **ABE production from yellow poplar through alkaline pre-hydrolysis, enzymatic saccharification, and fermentation**. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18: 965-971

Desai, R.P., Nielsen, L.K. and Papoutsakis, E.T. 1999. **Stoichiometric modeling of *Clostridium acetobutylicum* fermentations with non-linear constraints**. Journal of Biotechnology, 71: 191-205.

Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer, series in wood science, Springer-verlag, Berlin.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ghalem, B.R. and Mohamed, B. 2008. **Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis***. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(10): 211-215.

Ghalem, B.R. and Mohamed, B. 2012. **Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(9): 739-742.

Guan, W., Shi, S., Tu, M. and Lee, Y.Y. 2016. **Acetone–butanol–ethanol production from Kraft paper mill sludge by simultaneous saccharification and fermentation**. Bioresource Technology, 200: 713-721.

Han, L.J., Feng, S., Zhang, Z., Ma, Y., Wang, X. and Zhang, X. 2012. **Alkali pretreated of wheatstraw and its enzymatic hydrolysis**. Brazilian Journal of Microbiology, 43(1): 53-61.

Kang, L., Wang, W., Pallapolu, V.R., and Lee, Y.Y. 2011. **Enhanced ethanol production from de-ashed paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation and simultaneous saccharification and co-fermentation**. BioResources, 6(4): 3791-3808.

Lawson, P.A. and Rainey, F.A. 2016. **Proposal to restrict the genus *Clostridium prazmowski* to *Clostridium butyricum* and related species**. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66: 1009-1016.

Martin-Sampedro, R., Revilla, E., Villar, J.C. and Eugenio, M.E. 2014. **Enhancement of enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus*: Steam explosion versus steam treatment**. Bioresource Technology, 167: 186-191.

McNeil, B., and Kristiahsen, B. 1985. **Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum***. Biotechnology Letters, 7: 499-502.

Noomtim, P. and Cheirsilp, B. 2011. **Production of butanol from palm empty fruit bunches hydrolyzate by *Clostridium acetobutylicum***. Energy Procedia, 9: 140-146.

Olsson, L., and Hahn-Hägerdal, B. 1996. **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production**. Enzyme and Microbial Technology, 18: 312-331.

เอกสารนี้เป็น[illegible]ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. 2006. **Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes***. Journal of food protection, 69: 1046-1055.

Patt, R., Kordsachia, O. and Fehr, J., 2006. **European hardwoods versus *Eucalyptus globulus* as a raw material for pulping**. Water Science and Technology, 40: 39-48.

Pontheina, W. and Cheirsilpa, B. 2011. **Development of acetone butanol ethanol (ABE) production from palm pressed fiber by mixed culture of *Clostridium* sp. and *Bacillus* sp.** Energy Procedia, 9: 459-467.

Silva Morais, A.P., Sansígolo, C.A. and Neto, O. 2016. **Effects of autohydrolysis of *Eucalyptus urograndis* and *Eucalyptus grandis* on influence of chemical components and crystallinity index**. Bioresource Technology, 214: 623-628.

Shukor, H., Al-Shorgani, N.K.N., Abdeshahian, P., Hamid, A.A., Anuar, N., Rahman, N.A. and Kalil, M.S. 2014. **Production of butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 from palm kernel cake in acetone–butanol–ethanol fermentation using an empirical model**. Bioresource Technology, 170: 565-573.

Tamburini, E., Daly, S., Steiner, U., Vandini, C. and Mastromei, G. 2001. ***Clostridium felsineum* and *Clostridium acetobutylicum* are two distinct species that are phylogenetically closely related.** Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 963-966.

Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., Sakai, K. and Sonomoto, K. 2015. **Feasibility of acetone–butanol–ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate without nutrients supplementation**. Applied Energy, 140: 113-119.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

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

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

- อบกลูโคสที่ตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น เพื่อทิ้งให้เย็น
- ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 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

ดังนั้นการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัม จากสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ ก.1

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

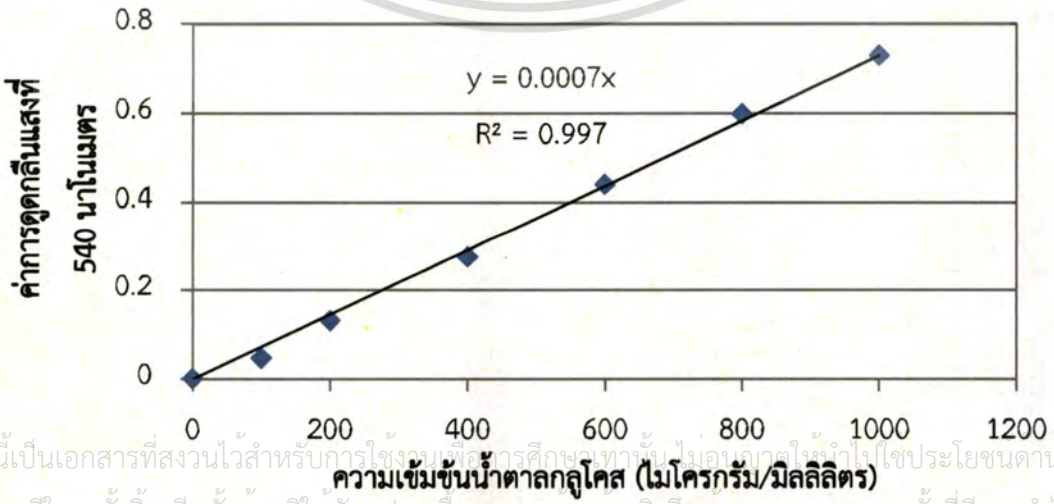
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	-	5
100	0.5	4.5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	-

ตารางที่ ก.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0	0
100	0.046
200	0.131
400	0.275
600	0.44
800	0.598
1000	0.729



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

$$= 1.84 \text{ โมลาร์}$$

นำค่าความเข้มข้นเข้าสมการ

$C_1V_1 = C_2V_2$

$18.4\ M\ (V_1) = (1\ M)(1000\ mL)$

$V_1 = 54.35\ mL$

ดังนั้น ปิเปตต์กรดซัลฟิวริกมา 54.35 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จะได้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 โมลาร์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

$$C = 17.49 \text{ โมลาร์}$$

เตรียมสารละลาย (Stock) กรดอะซิติกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

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

$V_1 = 2.86\ mL$

ดังนั้น ปิเปตต์กรดอะซิติกมา 2.86 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้กรดอะซิติกเข้มข้น 1 โมลาร์

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

$C_1V_1 = C_2V_2$

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

$V_1 = 2\ mL$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ จากสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานความเขมขน 1 โมลาร์ ดังตารางที่ ก.3

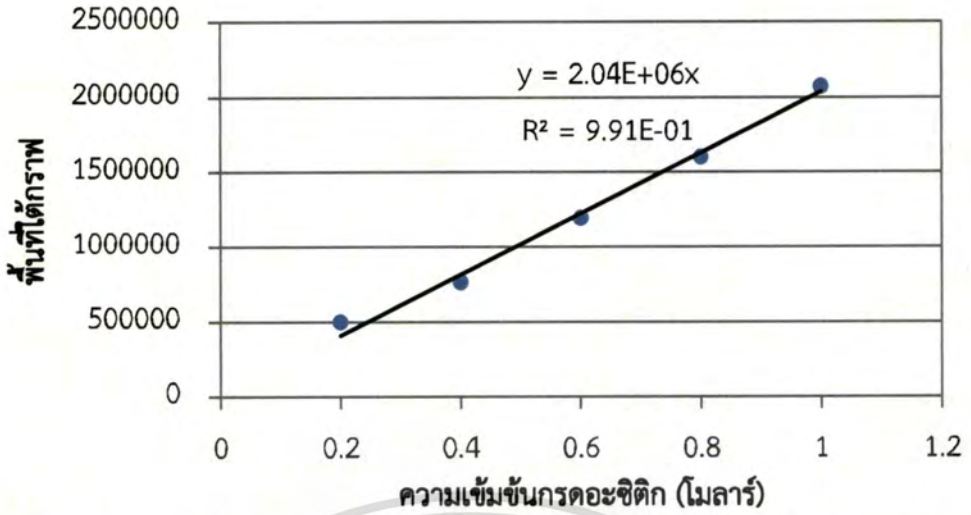
ตารางที่ ก.3 การเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดอะซิติก (โมลาร์)	ปริมาตรกรดอะซิติก (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.2 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

ดังนั้น ปิเปตต์กรดบิวทิริกมา 4.65 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้กรดบิวทิริกเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมสารละลาย Standard กรดบิวทิริกความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้กรดบิวทิริกความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ จากสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐานความเขมขน 1 โมลาร์ ดังตารางที่ ก.5

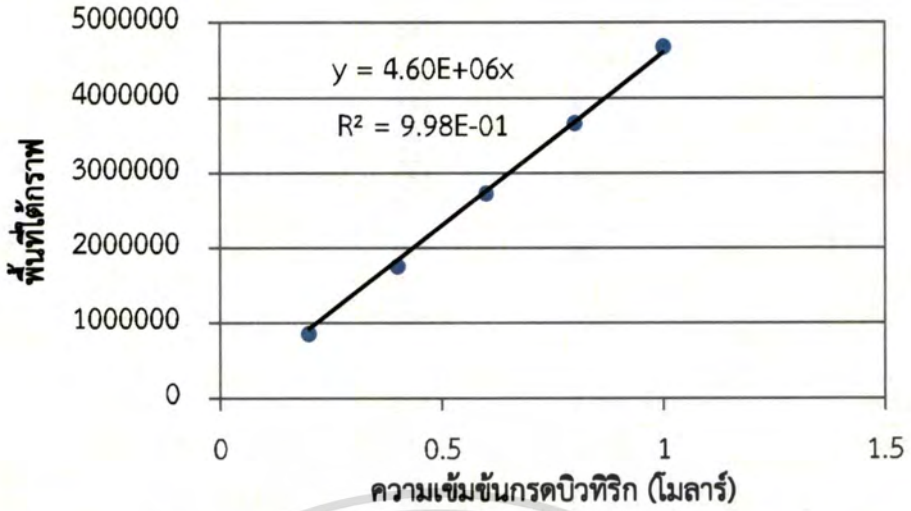
ตารางที่ ก.5 การเตรียมสารละลายกรดบิวทิริกมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดบิวทิริก (โมลาร์)	ปริมาตรกรดบิวทิริก (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.3 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)

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

$$C = 13.62 \text{ โมลาร์}$$

เตรียมสารละลาย (Stock) อะซิโตนความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$13.62 \text{ M } (V_1) = (1 \text{ M})(50 \text{ mL})$$

$$V_1 = 3.67 \text{ mL}$$

ดังนั้น ปิเปตต์อะซิโตนมา 3.67 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้อะซิโตนเข้มข้น 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Standard อะซิโตนความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายอะซิโตนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้อะซิโตนความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ จากสารละลายอะซิโตนมาตรฐานความเขมขน 1 โมลาร์ ดังตารางที่ ก.7

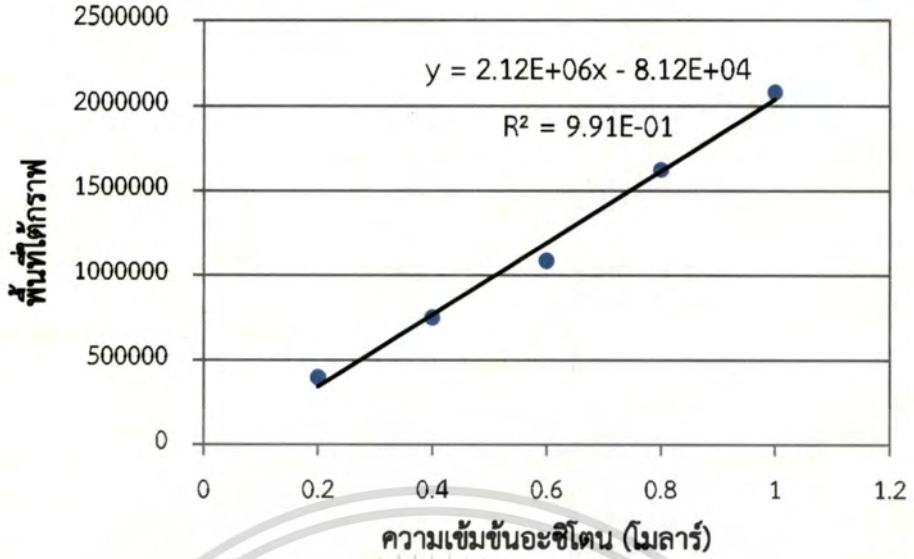
ตารางที่ ก.7 การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

ความเข้มข้นอะซิโตน (โมลาร์)	ปริมาตรอะซิโตน (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

ตารางที่ ก.8 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.4 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

ดังนั้น ปิเปตต์บิวทานอลมา 4.6 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้บิวทานอลเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมสารละลาย Standard บิวทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้บิวทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ จากสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเขมขน 1 โมลาร์ ดังตารางที่ ก.9

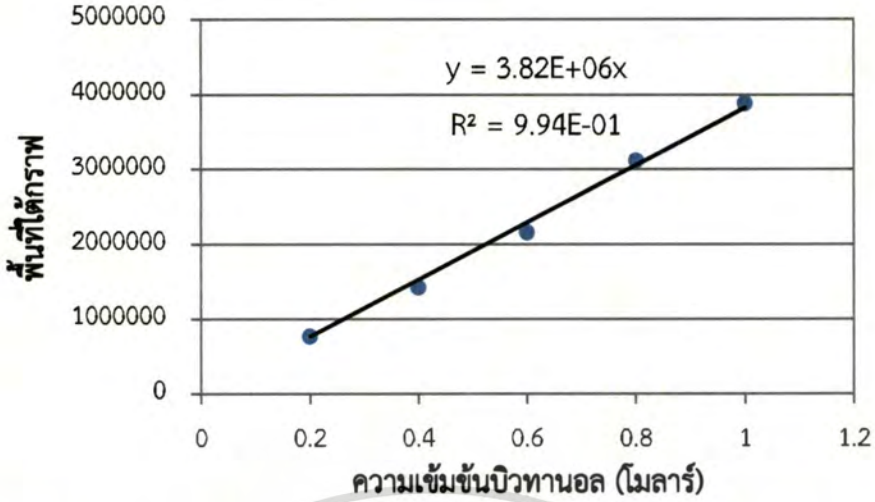
ตารางที่ ก.9 การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้นบิวทานอล (โมลาร์)	ปริมาตรบิวทานอล (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

ตารางที่ ก.10 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นบิวทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล
0.2	10.542
0.4	10.477
0.6	10.415
0.8	10.35
1.0	10.305

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.5 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

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

ดังนั้น ปิเปตต์เอทานอลมา 2.94 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้เอทานอลเข้มข้น 1 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย Standard เอทานอลความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จะต้องใช้เอทานอลความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์ จากสารละลายบเอทานอลมาตรฐานความเขมขน 1 โมลาร์ ดังตารางที่ ก.11

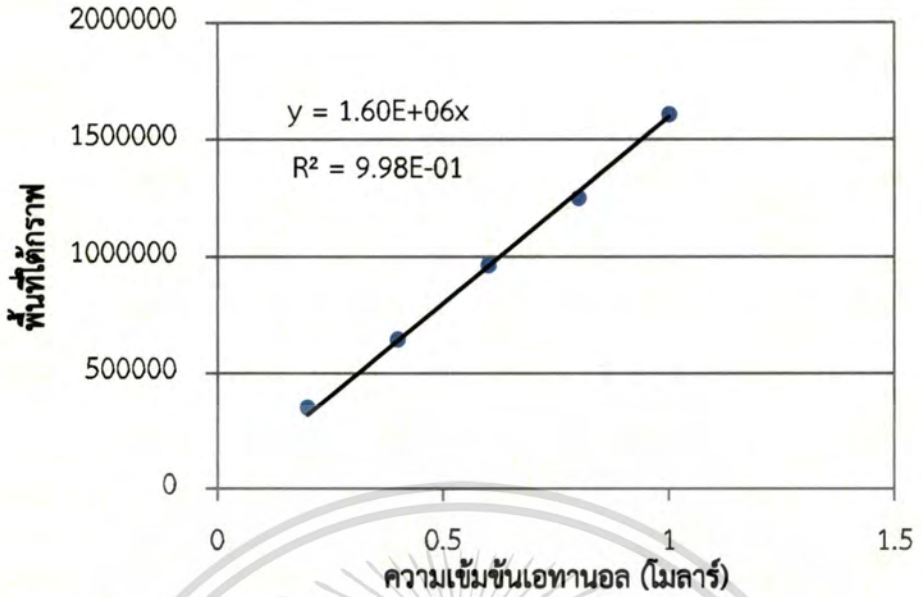
ตารางที่ ก.11 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้นเอทานอล (โมลาร์)	ปริมาตรเอทานอล (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

ตารางที่ ก.12 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.2 - 1.0 โมลาร์ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล
0	0
0.2	6.262
0.4	6.256
0.6	6.247
0.8	6.243
1.0	6.237

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.6 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

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร จากสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเขมขน 1 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ ก.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

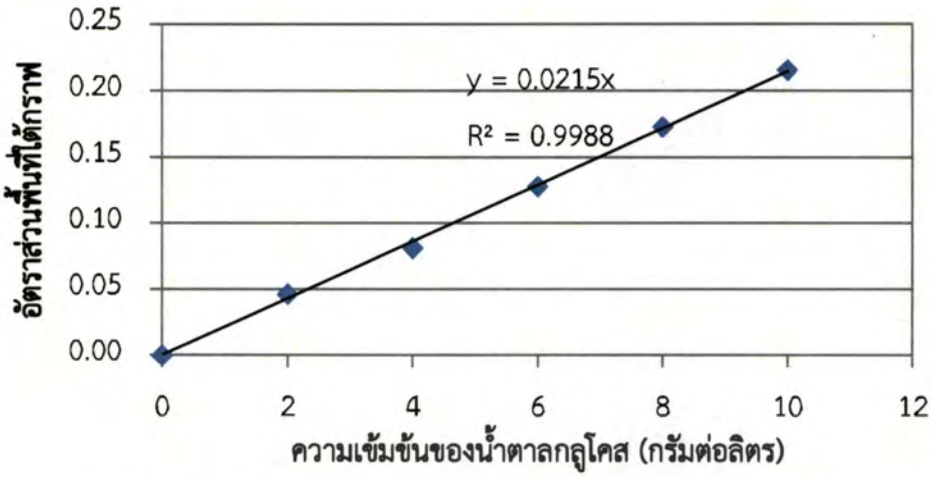
ตารางที่ ก.13 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ความเข้มข้นกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตรกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

ตารางที่ ก.14 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลกลูโคส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลกลูโคส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน
ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

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 คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้ไซโลสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐานความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร จากสารละลายไซโลสมาตรฐานความเขมขน 1 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ ก.15

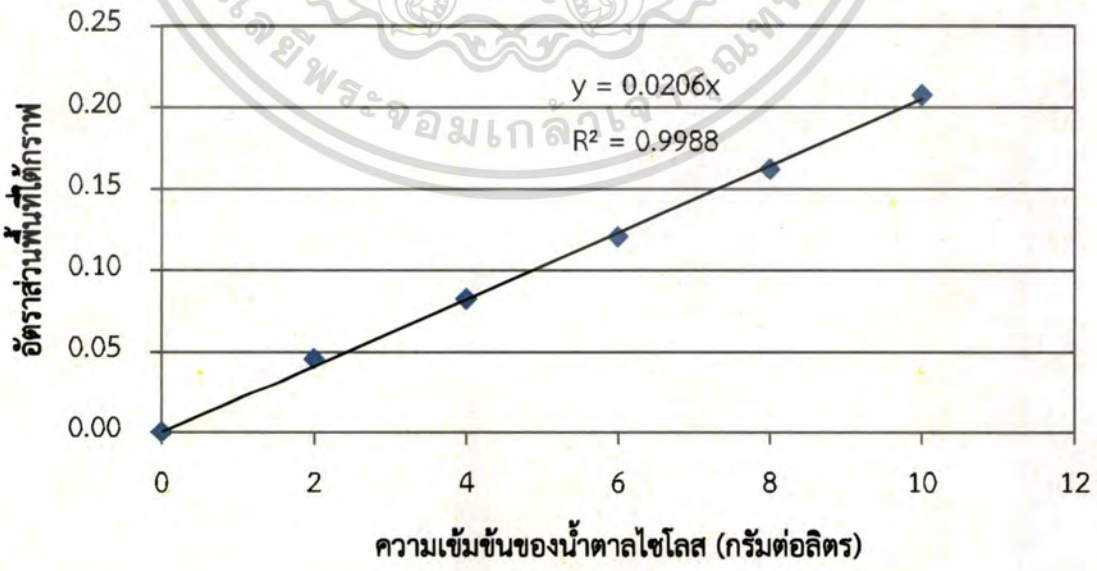
ตารางที่ ก.15 การเตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐาน

ความเข้มข้นไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตรไซโลส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.16 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลไซโลส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลไซโลส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
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.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 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

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้เซลโลไบโอสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐานความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร จากสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐานความเขมขน 1 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ ก.18

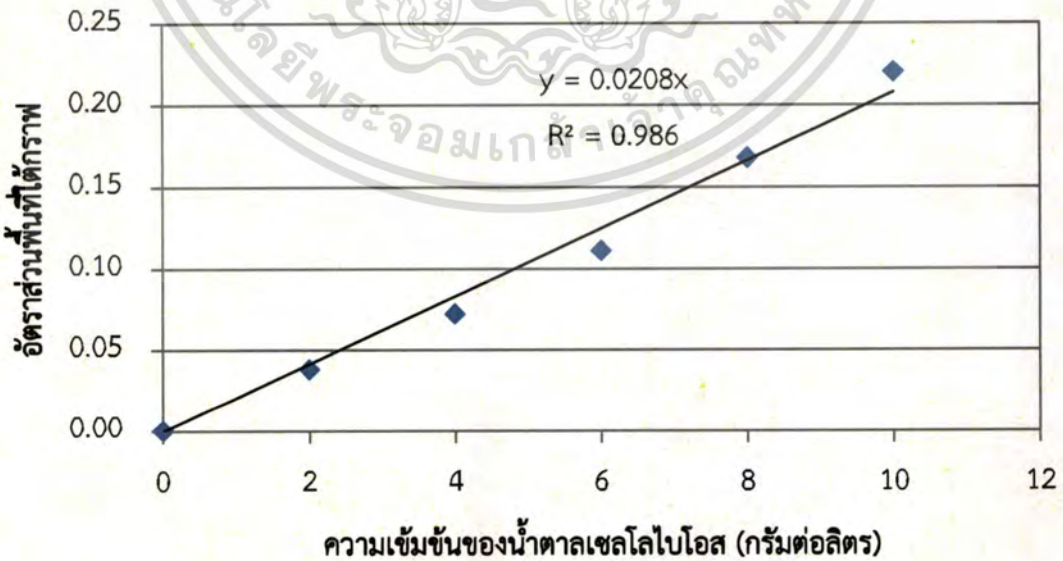
ตารางที่ ก.18 การเตรียมสารละลายเซลโลไบโอสมาตรฐาน

ความเข้มข้นเซลโลไบโอส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตรเซลโลไบโอส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.19 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลเซลโลไบโอส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลเซลโลไบโอส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
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



รูปที่ ก.9 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลเซลโลไบโอสมาตรฐาน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = 2\ mL$$

ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน 2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้มอลโตสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ดังนั้นการเตรียมสารละลายมอลโตสมาตรฐานความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตร จากสารละลายมอลโตสมาตรฐานความเขมขน 1 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ ก.20

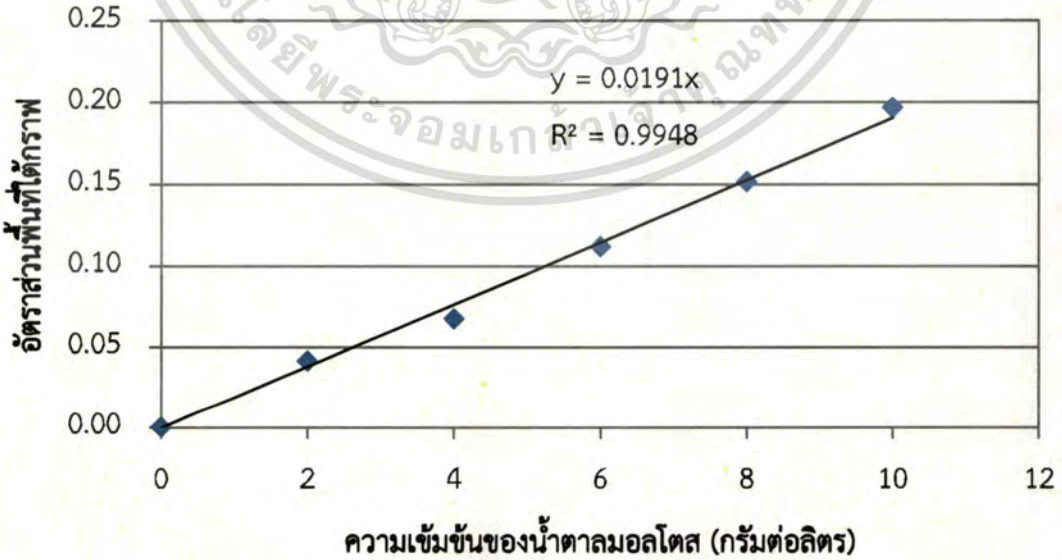
ตารางที่ ก.20 การเตรียมสารละลายมอลโตสมาตรฐาน

ความเข้มข้นมอลโตส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาตรมอลโตส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0.2	2	8
0.4	4	6
0.6	6	4
0.8	8	2
1.0	10	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.21 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายน้ำตาลมอลโตสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 - 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (Column oven) ทำงานที่ 65 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นน้ำตาลมอลโตสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลมอลโตส	พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล	พื้นที่ใต้กราฟน้ำตาลมอลโตส/พื้นที่ใต้กราฟกลีเซอรอล
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.9 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 โดยปิเปตต์กลีเซอรอลเข้มข้น 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 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นทำการไล่คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการปรับสภาพกิ่งยูคาลิปตัสด้วยกรดซัลฟิวริกด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1304.684	5	260.937	133.056	.000
Within Groups	11.767	6	1.961		
ทั้งหมด	1316.450	11			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	2	.8205			
0.2	2		23.5255		
1	2		25.7130	25.7130	
0.4	2			27.0880	
0.6	2			28.6505	
0.8	2				33.2130
Sig.		1.000	.169	.089	1.000

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	2	.8205	.0318	.0225	.5346	1.1064	.798	.843	
0.2	2	23.5255	1.5380	1.0875	9.7075	37.3435	22.438	24.613	
0.4	2	27.0880	.4950	.3500	22.6408	31.5352	26.738	27.438	
0.6	2	28.6505	2.5986	1.8375	5.3029	51.9982	26.813	30.488	
0.8	2	33.2130	1.0960	.7750	23.3657	43.0603	32.438	33.988	
1	2	25.7130	1.0960	.7750	15.8657	35.5603	24.938	26.488	
ทั้งหมด	12	23.1684	10.9397	3.1580	16.2177	30.1192	.798	33.988	
Fixed Effects			1.4004	.4043	22.1792	24.1576			
Random Effects				4.6631	11.1815	35.1552			129.4878

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการปรับสภาพกิ่งยูคาลิปตัสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.473	5	.095	2.874	.116
Within Groups	.198	6	.033		
ทั้งหมด	.671	11			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	2	.8155	
0.8	2	.9110	
0.6	2	1.0395	1.0395
1	2	1.1610	1.1610
0.4	2	1.2020	1.2020
0.2	2		1.4205
Sig.		.091	.093

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	2	.8155	.0389	.0275	.4661	1.1649	.788	.843	
0.2	2	1.4205	.1096	.0775	.4358	2.4052	1.343	1.498	
0.4	2	1.2020	.2418	.1710	-0.9708	3.3748	1.031	1.373	
0.6	2	1.0395	.1888	.1335	-0.6568	2.7358	.906	1.173	
0.8	2	.9110	.1937	.1370	-0.8298	2.6518	.774	1.048	
1	2	1.1610	.2291	.1620	-0.8974	3.2194	.999	1.323	
ทั้งหมด	12	1.0916	.2470	.0713	.9346	1.2485	.774	1.498	
Fixed Effects			.1815	.0524	.9634	1.2198			
Random Effects				.0888	.8632	1.3199			.0309

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการปรับสภาพกิ่งยูคาลิปตัสด้วยกรดซัลฟิวริกหลังทำการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีทางสถิติ

ตารางทดสอบผลกระทบระหว่างปัจจัยโดยตัวแปรตามเป็นน้ำตาล

แหล่ง	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26.843[a]	11	2.440	5.601	.000
Intercept	262.421	1	262.421	602.253	.000
เวลา	8.919	1	8.919	20.469	.000
ความเข้มข้นกรด	11.480	5	2.296	5.269	.002
เวลา * ความเข้มข้นกรด	6.445	5	1.289	2.958	.032
ความคลาดเคลื่อน	10.458	24	.436		
ทั้งหมด	299.722	36			
Corrected Total	37.301	35			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0.4	6	1.7067	
0	6	2.1546	
0.6	6		2.9973
0.2	6		3.0046
0.8	6		3.0983
1	6		3.2379
Sig.		.251	.571

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	N
24	0	1.5869	.1248	3
	0.2	2.9119	.9707	3
	0.4	1.4327	.3794	3
	0.6	2.4973	.2125	3
	0.8	2.9139	1.1666	3
	1	1.8702	.7761	3
	ทั้งหมด	2.2022	.8662	18
48	0	2.7223	.1649	3
	0.2	3.0973	.3771	3
	0.4	1.9806	.5606	3
	0.6	3.4973	.5265	3
	0.8	3.2827	.6438	3
	1	4.6056	.9711	3
	Total	3.1976	.9588	18
ทั้งหมด	0	2.1546	.6355	6
	0.2	3.0046	.6664	6
	0.4	1.7067	.5228	6
	0.6	2.9973	.6549	6
	0.8	3.0983	.8666	6
	1	3.2379	1.6920	6
	Total	2.6999	1.0323	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ในส่วนใสที่แยกจากการปรับสภาพกิ่งยูคาลิปตัสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังทำการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีทางสถิติ

ตารางทดสอบผลกระทบระหว่างปัจจัยโดยตัวแปรตามเป็นน้ำตาล

แหล่ง	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	547.639[a]	11	49.785	8.388	.000
Intercept	2989.857	1	2989.857	503.753	.000
เวลา	.648	1	103.250	17.396	.000
ความเข้มข้นเบส	516.249	5	.648	.109	.744
เวลา * ความเข้มข้นเบส	30.742	5	6.148	1.036	.419
ความคลาดเคลื่อน	142.444	24	5.935		
ทั้งหมด	3679.940	36			
Corrected Total	690.083	35			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	6	2.1546		
0.2	6		7.6225	
0.4	6		7.6517	
0.8	6			11.8600
0.6	6			12.5350
1	6			12.8558
Sig.		1.000	.984	.511

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	N
24	0	1.5869	.1248	3
	0.2	6.3058	1.7812	3
	0.4	7.6475	3.1342	3
	0.6	11.9058	3.1954	3
	0.8	11.9058	2.8112	3
	1	14.5225	3.2883	3
	ทั้งหมด	8.9791	4.9596	18
48	0	2.7223	.1649	3
	0.2	8.9392	1.3662	3
	0.4	7.6558	3.3221	3
	0.6	13.1642	1.8002	3
	0.8	11.8142	.8125	3
	1	11.1892	3.5288	3
	Total	9.2475	3.9947	18
ทั้งหมด	0	2.1546	.6355	6
	0.2	7.6225	2.0239	6
	0.4	7.6517	2.8886	6
	0.6	12.5350	2.4199	6
	0.8	11.8600	1.8514	6
	1	12.8558	3.5552	6
	Total	9.1132	4.4403	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในส่วนใสที่แยกจากการปรับสภาพกิ่งยูคาลิปตัสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังทำการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500 ที่ปริมาตรที่แตกต่างกันด้วยทางวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	413.329	9	45.925	27.804	.000
Within Groups	33.035	20	1.652		
ทั้งหมด	446.364	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0.05	3	5.5142					
0.1	3	6.3892					
0.15	3		8.7475				
0.2	3		10.2558	10.2558			
0.25	3			11.7642	11.7642		
0.3	3			12.0225	12.0225		
0.35	3				13.9725	13.9725	
0.4	3					15.5308	15.5308
0.5	3					15.7225	15.7225
0.45	3						16.6392
Sig.		.414	.166	.126	.059	.129	.330

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0.05	3	5.5142	1.8490	1.0675	.9209	10.1074	4.3725	7.6475	
0.1	3	6.3892	1.7078	.9860	2.1468	10.6315	4.4225	7.4975	
0.15	3	8.7475	1.8047	1.0419	4.2644	13.2306	7.0225	10.6225	
0.2	3	10.2558	.6048	.3492	8.7533	11.7583	9.5725	10.7225	
0.25	3	11.7642	.9227	.5327	9.4719	14.0564	10.7725	12.5975	
0.3	3	12.0225	1.2357	.7134	8.9529	15.0921	10.5975	12.7975	
0.35	3	13.9725	.9397	.5425	11.6380	16.3070	12.9975	14.8725	
0.4	3	15.5308	1.2074	.6971	12.5316	18.5301	14.1475	16.3725	
0.45	3	16.6392	1.0681	.6167	13.9859	19.2925	15.4225	17.4225	
0.5	3	15.7225	.8363	.4828	13.6450	17.8000	14.7725	16.3475	
ทั้งหมด	30	11.6558	3.9232	.7163	10.1909	13.1208	4.3725	17.4225	
Fixed Effects			1.2852	.2346	11.1664	12.1453			
Random Effects				1.2373	8.8569	14.4547			14.7579

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.926	9	.214	106.116	.000
Within Groups	.040	20	.002		
ทั้งหมด	1.966	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
168	3	4.7967			
120	3	4.8067			
144	3	4.8067			
72	3	4.8433			
96	3	4.8467			
36	3	4.8633			
48	3	4.8700			
24	3		5.0067		
12	3			5.3400	
0	3				5.5767
Sig.		.093	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	5.5767	.0153	.0088	5.5387	5.6146	5.560	5.590	
12	3	5.3400	.1114	.0643	5.0634	5.6166	5.240	5.460	
24	3	5.0067	.0252	.0145	4.9442	5.0692	4.980	5.030	
36	3	4.8633	.0451	.0260	4.7513	4.9754	4.820	4.910	
48	3	4.8700	.0200	.0115	4.8203	4.9197	4.850	4.890	
72	3	4.8433	.0379	.0219	4.7493	4.9374	4.800	4.870	
96	3	4.8467	.0208	.0120	4.7950	4.8984	4.830	4.870	
120	3	4.8067	.0462	.0267	4.6919	4.9214	4.780	4.860	
144	3	4.8067	.0208	.0120	4.7550	4.8584	4.790	4.830	
168	3	4.7967	.0058	.0033	4.7823	4.8110	4.790	4.800	
ทั้งหมด	30	4.9757	.2604	.0475	4.8784	5.0729	4.780	5.590	
Fixed Effects			.0449	.0082	4.9586	4.9928			
Random Effects				.0845	4.7846	5.1667			.0707

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.392	9	.044	12.192	.000
Within Groups	.071	20	.004		
ทั้งหมด	.463	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
168	3	4.8467			
144	3	4.8633	4.8633		
72	3	4.9500	4.9500	4.9500	
96	3		4.9700	4.9700	
120	3		4.9733	4.9733	
48	3			4.9933	
36	3			5.0233	
24	3				5.1533
0	3				5.1600
12	3				5.1900
Sig.		.057	.050	.191	.486

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	5.1600	.0500	.0289	5.0358	5.2842	5.11	5.21	.
12	3	5.1900	.0755	.0436	5.0025	5.3775	5.12	5.27	
24	3	5.1533	.0153	.0088	5.1154	5.1913	5.14	5.17	
36	3	5.0233	.1007	.0581	4.7733	5.2734	4.93	5.13	
48	3	4.9933	.1021	.0590	4.7396	5.2471	4.92	5.11	
72	3	4.9500	.0436	.0252	4.8417	5.0583	4.92	5.00	
96	3	4.9700	.0436	.0252	4.8617	5.0783	4.94	5.02	
120	3	4.9733	.0322	.0186	4.8935	5.0532	4.95	5.01	
144	3	4.8633	.0322	.0186	4.7835	4.9432	4.84	4.90	
168	3	4.8467	.0289	.0167	4.7750	4.9184	4.83	4.88	
ทั้งหมด	30	5.0123	.1264	.0231	4.9651	5.0595	4.83	5.27	
Fixed Effects			.0598	.0109	4.9896	5.0351			
Random Effects				.0381	4.9262	5.0985			.0133

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.234	9	.026	8.045	.000
Within Groups	.065	20	.003		
ทั้งหมด	.298	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
168	3	4.5033	
144	3	4.5100	
96	3		4.6600
120	3		4.6633
72	3		4.6800
36	3		4.7000
48	3		4.7100
24	3		4.7400
12	3		4.7533
0	3		4.7700
Sig.		.887	.051

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	4.7700	.08544	.04933	4.5578	4.9822	4.69	4.86	
12	3	4.7533	.07506	.04333	4.5669	4.9398	4.68	4.83	
24	3	4.7400	.06000	.03464	4.5910	4.8890	4.68	4.80	
36	3	4.7000	.08185	.04726	4.4967	4.9033	4.61	4.77	
48	3	4.7100	.04583	.02646	4.5962	4.8238	4.66	4.75	
72	3	4.6800	.05000	.02887	4.5558	4.8042	4.63	4.73	
96	3	4.6600	.04000	.02309	4.5606	4.7594	4.62	4.70	
120	3	4.6633	.03215	.01856	4.5835	4.7432	4.64	4.70	
144	3	4.5100	.03000	.01732	4.4355	4.5845	4.48	4.54	
168	3	4.5033	.03055	.01764	4.4274	4.5792	4.47	4.53	
ทั้งหมด	30	4.6690	.10145	.01852	4.6311	4.7069	4.47	4.86	
Fixed Effects			.05683	.01038	4.6474	4.6906			
Random Effects				.02943	4.6024	4.7356			.0076

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.598	9	1.400	6.883	.000
Within Groups	4.068	20	.203		
ทั้งหมด	16.666	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	.1600	
12	3	.1733	
168	3	.5467	
144	3	.5733	
24	3	.5867	
120	3	.6200	
96	3	.7133	
36	3		1.5133
72	3		1.5533
48	3		2.2733
Sig.		.201	.064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.1600	.1908	.1102	-.3139	.6339	.0400	.3800	
12	3	.1733	.11015	.0636	-.1003	.4470	.1000	.3000	
24	3	.5867	.2139	.1235	.0554	1.1179	.3400	.7200	
36	3	1.5133	1.0977	.6338	-1.2135	4.2402	.8400	2.7800	
48	3	2.2733	.7366	.4253	.4436	4.1031	1.6000	3.0600	
72	3	1.5533	.0757	.0437	1.3652	1.7414	1.5000	1.6400	
96	3	.7133	.1922	.1110	.2359	1.1907	.5400	.9200	
120	3	.6200	.3365	.1943	-.2158	1.4558	.2400	.8800	
144	3	.5733	.1361	.0786	.2352	.91152	.4200	.6800	
168	3	.5467	.1332	.0769	.2159	.8775	.4000	.6600	
ทั้งหมด	30	.8713	.7581	.1384	.5883	1.1544	.0400	3.0600	
Fixed Effects			.4510	.0823	.6996	1.0431			
Random Effects				.2160	.3827	1.3600			.3988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.10 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	168.299	9	18.700	.928	.522
Within Groups	402.863	20	20.143		
ทั้งหมด	571.161	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
12	3	.2733
144	3	.3067
36	3	.3133
24	3	.3333
168	3	.3400
120	3	.3867
48	3	.4333
72	3	.6800
96	3	.7133
0	3	8.3000
Sig.		.073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	8.3000	14.1857	8.1901	-26.9392	43.5392	.0400	24.6800	
12	3	.2733	.0416	.0240	.1699	.3768	.2400	.3200	
24	3	.3333	.1361	.0786	-.0049	.6715	.1800	.4400	
36	3	.3133	.1172	.0677	.0222	.6044	.1800	.4000	
48	3	.4333	.2548	.1471	-.1997	1.0663	.1400	.6000	
72	3	.6800	.1000	.0577	.4316	.9284	.5800	.7800	
96	3	.7133	.2774	.1601	.0243	1.4024	.4800	1.0200	
120	3	.3867	.0808	.0467	.1859	.5875	.3400	.4800	
144	3	.3067	.0306	.0176	.2308	.3826	.2800	.3400	
168	3	.3400	.0693	.0400	.1679	.5121	.3000	.4200	
ทั้งหมด	30	1.2080	4.4379	.8103	-.4492	2.8652	.0400	24.6800	
Fixed Effects			4.4881	.8194	-.5013	2.9173			
Random Effects				.8194[a]	-.6456[a]	3.0616[a]			-.4811

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.11 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1128.130	9	125.348	.935	.517
Within Groups	2681.415	20	134.071		
ทั้งหมด	3809.545	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
120	3	.0467
144	3	.0800
168	3	.1067
12	3	.1333
0	3	.2133
36	3	.3400
72	3	.3600
48	3	.4733
24	3	10.1600
96	3	19.2133
Sig.		.095

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.2133	.1419	.0819	-.1391	.5658	.0600	.3400	
12	3	.1333	.0231	.0133	.0760	.1907	.1200	.1600	
24	3	10.1600	16.4894	9.5202	-30.8020	51.1220	.5400	29.2000	
36	3	.3400	.2163	.1249	-.1974	.8774	.1600	.5800	
48	3	.4733	.1419	.0819	.1209	.8258	.3200	.6000	
72	3	.3600	.3143	.1815	-.4208	1.1408	.0000	.5800	
96	3	19.2133	32.6897	18.8734	-61.9924	100.4191	.2400	56.9600	
120	3	.0467	.0306	.0176	-.0292	.1226	.0200	.0800	
144	3	.0800	.0200	.0115	.0303	.1297	.0600	.1000	
168	3	.1067	.0231	.0133	.0493	.1640	.0800	.1200	
ทั้งหมด	30	3.1127	11.4614	2.0926	-1.1671	7.3924	.0000	56.9600	
Fixed Effects			11.5789	2.1140	-1.2971	7.5224			
Random Effects				2.1140[a]	-1.6695[a]	7.8949[a]			-2.9077

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.12 การวิเคราะห์ความขุ่นอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.780	9	3.198	4.335	.003
Within Groups	14.754	20	.738		
ทั้งหมด	43.534	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
12	3	.2617		
120	3	.2883		
0	3	.3657		
144	3	.5397		
96	3	.6347		
24	3	1.0067		
168	3	1.4767	1.4767	
36	3	1.6950	1.6950	1.6950
48	3		2.7850	2.7850
72	3			3.0870
Sig.		.089	.092	.074

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.3657	.0418	.0241	.2619	.4695	.3200	.4020	
12	3	.2617	.1400	.0808	-.0860	.6094	.1480	.4180	
24	3	1.0067	.0746	.0431	.8214	1.1919	.9540	1.0920	
36	3	1.6950	.0436	.0252	1.5867	1.8033	1.6650	1.7450	
48	3	2.7850	.5287	.3052	1.4718	4.0982	2.3200	3.3600	
72	3	3.0870	2.6457	1.5275	-3.4853	9.6593	.7510	5.9600	
96	3	.6347	.2072	.1196	.1200	1.1493	.3960	.7680	
120	3	.2883	.0110	.0064	.2610	.3157	.2810	.3010	
144	3	.5397	.1386	.0800	.1954	.8839	.4040	.6810	
168	3	1.4767	.0813	.0469	1.2747	1.6786	1.4050	1.5650	
ทั้งหมด	30	1.2140	1.2252	.2237	.7565	1.6715	.1480	5.9600	
Fixed Effects			.8589	.1568	.8869	1.5411			
Random Effects				.3265	.4755	1.9526			.8200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.13 การวิเคราะห์ความขุ่นอาหารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.001	9	.111	2.543	.039
Within Groups	.875	20	.044		
ทั้งหมด	1.876	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
12	3	.3493	
36	3	.3783	
48	3	.4247	
0	3	.4493	
24	3	.5223	
144	3	.5990	
120	3	.6190	.6190
168	3	.6417	.6417
72	3	.6963	.6963
96	3		1.0013
Sig.		.093	.052

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.4493	.2349	.1356	-.1341	1.0328	.2830	.7180	
12	3	.3493	.1135	.0655	.0674	.6313	.2350	.4620	
24	3	.5223	.2460	.1421	-.0889	1.1336	.2400	.6910	
36	3	.3783	.2010	.1161	-.1211	.8777	.1750	.5770	
48	3	.4247	.2166	.1251	-.1134	.9627	.2120	.6450	
72	3	.6963	.0888	.0512	.4759	.9168	.6150	.7910	
96	3	1.0013	.4247	.2452	-.0537	2.0564	.7210	1.4900	
120	3	.6190	.1669	.0964	.2044	1.0336	.4290	.7420	
144	3	.5990	.0403	.0232	.4990	.6990	.5550	.6340	
168	3	.6417	.0621	.0358	.4875	.7959	.5780	.7020	
ทั้งหมด	30	.5681	.2544	.0464	.4732	.6631	.1750	1.4900	
Fixed Effects			.2092	.0382	.4885	.6478			
Random Effects				.0609	.4304	.7059			.02250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.14 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.153	9	.017	1.125	.391
Within Groups	.303	20	.015		
ทั้งหมด	.456	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
120	3	.1817
48	3	.2353
36	3	.2450
144	3	.2467
12	3	.2633
72	3	.3120
168	3	.3123
96	3	.3647
0	3	.3830
24	3	.4203
Sig.		.053

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.3830	.2287	.1321	-.1852	.9512	.2230	.6450	
12	3	.2633	.1040	.0600	.0050	.5217	.1600	.3680	
24	3	.4203	.2288	.1321	-.1480	.9887	.2740	.6840	
36	3	.2450	.0783	.0452	.0505	.4395	.1710	.3270	
48	3	.2353	.1187	.0686	-.0596	.5303	.1300	.3640	
72	3	.3120	.0671	.0387	.1453	.4787	.2390	.3710	
96	3	.3647	.0906	.0523	.1395	.5898	.2600	.4170	
120	3	.1817	.0143	.0083	.1462	.2172	.1660	.1940	
144	3	.2467	.0360	.0208	.1572	.3361	.2110	.2830	
168	3	.3123	.0396	.0229	.2140	.4107	.2880	.3580	
ทั้งหมด	30	.2964	.1255	.0229	.2496	.3433	.1300	.6840	
Fixed Effects			.1231	.0225	.2496	.3433			
Random Effects				.0238	.2425	.3504			.0006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.15 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุม ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	352.894	9	39.210	8.643	.000
Within Groups	90.738	20	4.537		
ทั้งหมด	443.632	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
96	3	38.2381				
144	3		43.6191			
120	3		44.4524	44.4524		
72	3		44.9286	44.9286	44.9286	
168	3		45.4286	45.4286	45.4286	
48	3		45.6905	45.6905	45.6905	
24	3			48.2381	48.2381	48.2381
0	3				48.6191	48.6191
36	3				48.6429	48.6429
12	3					51.3810
Sig.		1.000	.297	.063	.071	.112

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	48.6191	3.0651	1.7696	41.0050	56.2331	46.571	52.143	
12	3	51.3810	1.7862	1.0313	46.9438	55.8181	50.143	53.429	
24	3	48.2381	.4592	.2651	47.0973	49.3789	47.714	48.571	
36	3	48.6429	4.2009	2.4254	38.2071	59.0786	44.214	52.571	
48	3	45.6905	2.3715	1.3692	39.7993	51.5817	44.286	48.429	
72	3	44.9286	2.2576	1.3035	39.3203	50.5369	42.571	47.071	
96	3	38.2381	1.5259	.8810	34.4477	42.0285	36.500	39.357	
120	3	44.4524	.7835	.4524	42.5059	46.3988	43.571	45.071	
144	3	43.6191	.6075	.3507	42.1100	45.1281	42.929	44.071	
168	3	45.4286	.9449	.5456	43.0813	47.7759	44.714	46.500	
ทั้งหมด	30	45.9238	3.9112	.7141	44.4633	47.3843	36.500	53.429	
Fixed Effects			2.1300	.3889	45.1126	46.7350			
Random Effects				1.1433	43.3376	48.5100			11.5578

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.16 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลอง ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	504.697	9	56.077	6.110	.000
Within Groups	183.548	20	9.177		
ทั้งหมด	688.244	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
168	3	31.2857		
144	3	32.0952		
120	3	35.1905	35.1905	
96	3		38.4286	38.4286
24	3		40.5952	40.5952
12	3			40.9524
72	3			41.1667
36	3			42.2381
48	3			42.5238
0	3			42.6191
Sig.		.150	.050	.152

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	42.6191	2.6432	1.5260	36.0530	49.1851	40.000	45.286	
12	3	40.9524	1.7222	.99432	36.6742	45.2306	39.143	42.571	
24	3	40.5952	1.8822	1.0867	35.9197	45.2708	38.500	42.143	
36	3	42.2381	3.9906	2.3040	32.3248	52.1514	38.714	46.571	
48	3	42.5238	4.9741	2.8718	30.1675	54.8801	38.286	48.000	
72	3	41.1667	5.2685	3.0418	28.0791	54.2543	37.571	47.214	
96	3	38.4286	1.2206	.7047	35.3965	41.4606	37.286	39.714	
120	3	35.1905	1.6558	.956	31.0774	39.3036	33.429	36.714	
144	3	32.0952	1.3274	.7664	28.7979	35.3926	31.000	33.571	
168	3	31.2857	1.9653	1.1346	26.4037	36.1677	29.286	33.214	
ทั้งหมด	30	38.7095	4.8716	.8894	36.8904	40.5286	29.286	48.000	
Fixed Effects			3.0294	.5531	37.5558	39.8633			
Random Effects				1.3672	35.6167	41.8024			15.6333

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.17 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	691.735	9	76.859	11.668	.000
Within Groups	131.748	20	6.587		
ทั้งหมด	823.484	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
168	3	37.9286		
72	3	38.6667		
0	3	39.1429		
96	3	39.3333		
120	3	39.3333		
144	3	40.3333	40.3333	
24	3	41.7619	41.7619	
12	3	42.0476	42.0476	
48	3		44.3095	
36	3			55.1429
Sig.		.101	.096	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	39.1429	2.6688	1.5408	32.5132	45.7725	36.286	41.571	
12	3	42.0476	3.5408	2.0443	33.2517	50.8435	38.000	44.571	
24	3	41.7619	3.8580	2.2274	32.1780	51.3458	37.857	45.571	
36	3	55.1429	3.6617	2.1141	46.0467	64.2391	51.286	58.571	
48	3	44.3095	1.2624	.72882	41.1737	47.4454	42.857	45.143	
72	3	38.6667	1.8631	1.0757	34.0385	43.2948	37.286	40.786	
96	3	39.3333	.1650	.0952	38.9236	39.7431	39.143	39.429	
120	3	39.3333	1.9396	1.1198	34.5152	44.1515	37.286	41.143	
144	3	40.3333	1.43801	.8303	36.7610	43.9057	39.000	41.857	
168	3	37.9286	2.6458	1.5275	31.3562	44.5010	34.929	39.929	
ทั้งหมด	30	41.8000	5.3288	.9729	39.8102	43.7898	34.929	58.571	
Fixed Effects			2.5666	.4686	40.8225	42.7775			
Random Effects				1.6006	38.1792	45.4209			23.4240

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.18 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.621	9	.069	20.393	.000
Within Groups	.068	20	.003		
ทั้งหมด	.688	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
24	3	.0000	
36	3	.0000	
48	3	.0000	
72	3	.0000	
96	3	.0000	
120	3	.0000	
144	3	.0000	
168	3	.0000	
12	3	.0640	
0	3		.4823
Sig.		.254	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.4823	.1467	.0847	.1178	.8468	.319	.603	
12	3	.0640	.1109	.0640	-.2114	.3394	.000	.192	
24	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
36	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
48	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
72	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
96	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
120	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
144	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
168	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
ทั้งหมด	30	.0546	.1541	.0281	-.0029	.1122	.000	.603	
Fixed Effects			.0582	.0106	.0325	.0768			
Random Effects				.0479	-.0538	.1631			.0219

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.19 การวิเคราะห์ความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.263	9	.363	16.976	.000
Within Groups	.427	20	.021		
ทั้งหมด	3.690	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
12	3	.6072				
0	3	.6921				
24	3		.9470			
168	3		1.0163	1.0163		
120	3			1.2284	1.2284	
144	3			1.2580	1.2580	
96	3				1.3467	1.3467
72	3					1.5271
48	3					1.5303
36	3					1.5815
Sig.		.485	.568	.068	.360	.085

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.6921	.0463	.0268	.5770	.8071	.665	.746	
12	3	.6072	.1455	.0840	.2457	.9686	.448	.733	
24	3	.9470	.1302	.0752	.62356	1.2704	.797	1.027	
36	3	1.5815	.1092	.0630	1.3103	1.8527	1.457	1.659	
48	3	1.5303	.1203	.0695	1.2313	1.8291	1.392	1.610	
72	3	1.5271	.0778	.0449	1.3340	1.7203	1.469	1.615	
96	3	1.3467	.1783	.1029	.9039	1.7896	1.141	1.455	
120	3	1.2284	.1571	.0907	.8382	1.6186	1.048	1.336	
144	3	1.2580	.1974	.1140	.7676	1.7483	1.031	1.389	
168	3	1.0163	.2131	.1230	.4869	1.5456	.771	1.159	
ทั้งหมด	30	1.1734	.3567	.0651	1.0403	1.3066	.448	1.659	
Fixed Effects			.1461	.0267	1.1178	1.2291			
Random Effects				.1099	.9248	1.4221			.1137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.20 การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.850	9	.206	14.856	.000
Within Groups	.277	20	.014		
ทั้งหมด	2.127	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
72	3	.7559		
168	3	.7778		
24	3	.8012		
120	3	.8272		
96	3	.8397	.8397	
48	3	.8527	.8527	
12	3	.9469	.9469	
36	3	.9650	.9650	
144 h	3		1.0577	
0 h	3			1.6419
Sig.		.071	.053	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	1.6419	.2859	.1651	.9316	2.3522	1.320	1.867	
12	3	.9469	.1317	.0760	.6197	1.2740	.795	1.030	
24	3	.8012	.0975	.0563	.5591	1.0433	.691	.874	
36	3	.9650	.0103	.0060	.9394	.9906	.955	.976	
48	3	.8527	.0848	.0489	.6421	1.0633	.756	.916	
72	3	.7559	.0168	.0097	.7143	.7976	.738	.771	
96	3	.8397	.0331	.0191	.7574	.9220	.801	.861	
120	3	.8272	.0613	.0354	.6749	.9795	.757	.866	
144	3	1.0577	.0341	.0197	.9729	1.1425	1.018	1.079	
168	3	.7778	.1272	.0734	.4619	1.0937	.631	.859	
ทั้งหมด	30	.9466	.2708	.0494	.8455	1.0477	.631	1.867	
Fixed Effects			.1177	.0215	.9018	.9914			
Random Effects				.0828	.7594	1.1339			.0639

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.21 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.108	9	1.123	13.738	.000
Within Groups	1.635	20	.082		
ทั้งหมด	11.743	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
48	3	1.3771		
120	3	1.3959		
36	3	1.4643		
72	3	1.4692		
24	3	1.4693		
168	3	1.4834		
96	3	1.4957		
144	3	1.5905	1.5905	
12	3		2.0287	
0	3			3.3745
Sig.		.432	.075	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	3.3745	.7890	.4556	1.4144	5.3346	2.464	3.866	
12	3	2.0287	.3078	.1777	1.2641	2.7933	1.674	2.217	
24	3	1.4693	.1283	.0741	1.1507	1.7879	1.321	1.547	
36	3	1.4647	.0203	.0117	1.4139	1.5147	1.442	1.481	
48	3	1.3771	.1307	.0755	1.0524	1.7017	1.231	1.483	
72	3	1.4692	.0739	.0426	1.2857	1.6527	1.394	1.542	
96	3	1.4957	.0409	.0236	1.3940	1.5974	1.449	1.523	
120	3	1.3959	.1012	.0584	1.1445	1.6473	1.283	1.480	
144	3	1.5905	.1194	.0689	1.2939	1.8872	1.454	1.678	
168	3	1.4834	.1860	.1074	1.0212	1.9455	1.279	1.643	
ทั้งหมด	30	1.7149	.6363	.1162	1.4772	1.9525	1.231	3.866	
Fixed Effects			.2859	.0522	1.6060	1.8237			
Random Effects				.1935	1.2772	2.1526			.3471

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.22 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดบิวทิริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดควบคุมที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.589	9	3.510	43.764	.000
Within Groups	1.604	20	.080		
ทั้งหมด	33.193	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.2623			
12	3	.3489			
24	3		2.1094		
168	3		2.2585		
120	3		2.5801	2.5801	
96	3			2.8045	2.8045
144	3			2.8872	2.8872
48	3			3.0231	3.0231
36	3			3.0955	3.0955
72	3				3.1498
Sig.		.712	.067	.057	.194

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.2623	.0357	.0206	.1737	.3509	.229	.300	
12	3	.3489	.1343	.0775	.0153	.6824	.199	.457	
24	3	2.1094	.2582	.1491	1.4680	2.7509	1.811	2.261	
36	3	3.0955	.1491	.0861	2.7252	3.4658	2.924	3.197	
48	3	3.0231	.3523	.2034	2.1478	3.8983	2.626	3.300	
72	3	3.1498	.1369	.0791	2.8097	3.4900	2.992	3.238	
96	3	2.8045	.3481	.2010	1.9398	3.6691	2.427	3.113	
120	3	2.5801	.3455	.1995	1.7217	3.4385	2.195	2.863	
144	3	2.8872	.2742	.1583	2.2061	3.5684	2.596	3.141	
168	3	2.2585	.4850	.2800	1.0538	3.4632	1.704	2.603	
ทั้งหมด	30	2.2519	1.0699	.1953	1.8524	2.6514	.199	3.300	
Fixed Effects			.2832	.0517	2.1441	2.3598			
Random Effects				.3420	1.4782	3.0257			1.1432

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.23 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.127	9	.014	.935	.517
Within Groups	.303	20	.015		
ทั้งหมด	.430	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
36	3	.0000
48	3	.0000
72	3	.0000
96	3	.0000
120	3	.0000
144	3	.0000
168	3	.0000
0	3	.0427
24	3	.0630
12	3	.2170
Sig.		.076

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.0427	.0739	.0427	-.1409	.2263	.000	.128	
12	3	.2170	.3759	.2170	-.7167	1.1507	.000	.651	
24	3	.0630	.0679	.0392	-.1058	.2318	.000	.135	
36	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
48	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
72	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
96	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
120	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
144	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
168	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
ทั้งหมด	30	.0323	.1218	.0222	-.0132	.0777	.000	.651	
Fixed Effects			.1230	.0225	-.0146	.07912			
Random Effects				.0225[a]	-.0185[a]	.08308[a]			-.0003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.24 การวิเคราะห์ความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.054	9	.006	.437	.899
Within Groups	.274	20	.014		
ทั้งหมด	.328	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
72	3	.2975
0	3	.3170
168	3	.3215
36	3	.3596
48	3	.3613
144	3	.3743
24	3	.3814
120	3	.3964
96	3	.4149
12	3	.4382
Sig.		.216

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.3170	.1031	.0595	.0609	.5732	.200	.395	
12	3	.4382	.1786	.1031	-.0055	.8819	.302	.640	
24	3	.3814	.1583	.0914	-.0117	.7746	.231	.547	
36	3	.3596	.1895	.1094	-.1112	.8303	.191	.564	
48	3	.3613	.1032	.0596	.1051	.6176	.266	.471	
72	3	.2975	.0867	.0500	.0822	.5128	.233	.396	
96	3	.4149	.0505	.0292	.2894	.5404	.357	.451	
120	3	.3964	.0714	.0412	.2190	.5738	.344	.478	
144	3	.3743	.0320	.0185	.2949	.4538	.353	.411	
168	3	.3215	.0821	.0474	.1176	.5254	.238	.402	
ทั้งหมด	30	.3662	.1064	.0194	.3265	.4059	.191	.640	
Fixed Effects			.1171	.0214	.3216	.4108			
Random Effects				.0214[a]	.3179[a]	.4146[a]			-.0026

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.25 การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.405	9	.045	1.542	.200
Within Groups	.583	20	.029		
ทั้งหมด	.988	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
12	3	.5207	
72	3	.5533	
168	3	.6170	
96	3	.6286	
48	3	.6635	.6635
120	3	.6866	.6866
36	3	.6891	.6891
24	3	.7078	.7078
144	3	.7713	.7713
0	3		.9581
Sig.		.134	.074

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.9581	.1219	.0704	.6553	1.2609	.818	1.039	
12	3	.5207	.4513	.2606	-.6004	1.6419	.000	.799	
24	3	.7078	.0539	.0311	.5739	.8417	.648	.754	
36	3	.6891	.0664	.0383	.5242	.8539	.613	.736	
48	3	.6635	.1247	.0720	.3537	.9732	.520	.744	
72	3	.5533	.0983	.0567	.3092	.7973	.440	.619	
96	3	.6286	.0947	.0547	.3934	.8638	.520	.696	
120	3	.6866	.0183	.0106	.6411	.7320	.666	.700	
144	3	.7713	.1351	.0780	.4357	1.1068	.619	.876	
168	3	.6170	.1135	.0655	.3350	.8990	.486	.687	
ทั้งหมด	30	.6796	.1845	.0337	.6107	.7485	.000	1.039	
Fixed Effects			.1707	.0312	.6146	.7446			
Random Effects				.0387	.5920	.7672			.0053

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.26 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.829	9	.092	.638	.752
Within Groups	2.886	20	.144		
ทั้งหมด	3.715	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
12	3	2.2413
24	3	2.4845
72	3	2.4932
96	3	2.5954
48	3	2.6024
168	3	2.6701
36	3	2.6862
0	3	2.7100
120	3	2.7464
144	3	2.8795
Sig.		.090

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	2.7100	.3842	.2218	1.7554	3.6645	2.267	2.959	
12	3	2.2413	.2116	.1221	1.7157	2.7668	2.002	2.404	
24	3	2.4845	.2141	.1236	1.9527	3.0163	2.245	2.657	
36	3	2.6862	.2154	.1243	2.1512	3.2212	2.438	2.822	
48	3	2.6024	.4035	.2330	1.5999	3.6048	2.144	2.904	
72	3	2.4932	.4459	.2574	1.3855	3.6009	1.983	2.808	
96	3	2.5954	.4797	.2769	1.4039	3.7869	2.047	2.938	
120	3	2.7464	.1036	.0598	2.4891	3.0036	2.636	2.842	
144	3	2.8795	.5716	.3300	1.4595	4.2995	2.237	3.333	
168	3	2.6701	.4786	.2763	1.4812	3.8590	2.126	3.024	
ทั้งหมด	30	2.6109	.3579	.0653	2.4772	2.7445	1.983	3.333	
Fixed Effects			.3799	.0694	2.4662	2.7555			
Random Effects				.0694[a]	2.4540[a]	2.7678[a]			-.0174

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.27 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดบิวทิริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร T6 ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.699	9	1.300	17.794	.000
Within Groups	1.461	20	.073		
ทั้งหมด	13.160	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3	.0702			
24	3	.2481			
0	3	.3800			
36	3		.8754		
48	3		1.2203	1.2203	
72	3			1.3748	1.3748
168	3			1.4735	1.4735
120	3				1.7503
96	3				1.7583
144	3				1.7778
Sig.		.199	.134	.291	.115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วน. เบี่ยงเบน มาตรฐาน	ความคลาด เคลื่อน มาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ย ต่ำสุด	ค่าเฉลี่ย สูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.3800	.2007	.1159	-.1185	.8785	.149	.509	
12	3	.0702	.0347	.0200	-.0160	.1563	.044	.110	
24	3	.2481	.0609	.0352	.0968	.3994	.179	.294	
36	3	.8754	.4731	.2731	-.2998	2.0506	.525	1.413	
48	3	1.2203	.3666	.2116	.3098	2.1308	.810	1.515	
72	3	1.3748	.2027	.1170	.8712	1.8783	1.187	1.590	
96	3	1.7583	.2949	.1703	1.0257	2.4908	1.420	1.961	
120	3	1.7503	.1343	.0776	1.4164	2.0841	1.597	1.849	
144	3	1.7778	.3673	.2121	.8653	2.6903	1.356	2.025	
168	3	1.4735	.2148	.1240	.9399	2.0071	1.231	1.640	
ทั้งหมด	30	1.0929	.6736	.1230	.8413	1.3444	.044	2.025	
Fixed Effects			.2703	.0494	.9899	1.1958			
Random Effects				.2082	.6220	1.5637			.4089

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.28 การวิเคราะห์ความเข้มข้นอะซิโตนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.124	9	.014	2.905	.023
Within Groups	.095	20	.005		
ทั้งหมด	.218	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
72	3	.0000	
96	3	.0000	
120	3	.0000	
144	3	.0000	
168	3	.0000	
48	3	.0173	
36	3	.0363	
24	3	.0367	
12	3	.1197	.1197
0	3		.2023
Sig.		.079	.157

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.2023	.0296	.0171	.1289	.2758	.170	.228	
12	3	.1197	.2073	.1197	-.3952	.6346	.000	.359	
24	3	.0367	.0365	.0211	-.0540	.1273	.000	.073	
36	3	.0363	.0351	.0203	-.0508	.1235	.000	.070	
48	3	.0173	.0300	.0173	-.0573	.0919	.000	.052	
72	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
96	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
120	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
144	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
168	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
ทั้งหมด	30	.0412	.0868	.0158	.0088	.0736	.000	.359	
Fixed Effects			.0688	.0126	.0150	.0674			
Random Effects				.0214	-.0072	.0897			.0030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.29 การวิเคราะห์ความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัสชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.137	9	.015	.594	.787
Within Groups	.512	20	.026		
ทั้งหมด	.649	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05
		1
168	3	.2642
144	3	.2721
72	3	.279
120	3	.2902
48	3	.3189
96	3	.3192
12	3	.3382
36	3	.352
24	3	.3564
0	3	.5096
Sig.		.120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.5096	.1378	.0795	.1674	.8519	.352	.607	
12	3	.3382	.3040	.1755	-.4169	1.0934	.000	.589	
24	3	.3564	.1673	.0966	-.0591	.7719	.234	.547	
36	3	.3520	.1433	.0828	-.0041	.7080	.215	.501	
48	3	.3189	.1273	.0735	.0026	.6352	.208	.458	
72	3	.2790	.1343	.0776	-.0548	.6127	.194	.434	
96	3	.3192	.1257	.0726	.0070	.6314	.191	.442	
120	3	.2902	.1207	.0697	-.0097	.5900	.168	.410	
144	3	.2721	.1223	.0706	-.0317	.5759	.186	.412	
168	3	.2642	.1288	.0743	-.0557	.5841	.138	.396	
ทั้งหมด	30	.3300	.1496	.0273	.2741	.3858	.000	.607	
Fixed Effects			.1600	.0292	.2690	.3909			
Random Effects				.0292[a]	.2639[a]	.3961[a]			-.0035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.30 การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัสชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.288	9	.032	5.313	.001
Within Groups	.120	20	.006		
ทั้งหมด	.408	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
72	3	.1762		
12	3	.2268	.2268	
168	3	.2496	.2496	
96	3	.2634	.2634	
36	3	.2882	.2882	
48	3	.3065	.3065	
120	3	.3156	.3156	
24	3		.3313	
144	3		.3683	
0	3			.5568
Sig.		.066	.065	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.5568	.0610	.0352	.4053	.7082	.487	.601	
12	3	.2268	.1998	.1154	-.2695	.7232	.000	.377	
24	3	.3313	.0477	.0275	.2129	.4498	.278	.368	
36	3	.2882	.0250	.0144	.2262	.3503	.259	.303	
48	3	.3065	.0600	.0346	.1576	.4555	.237	.344	
72	3	.1762	.0421	.0243	.0715	.2808	.128	.201	
96	3	.2634	.0281	.0162	.1937	.3331	.231	.281	
120	3	.3156	.0105	.0061	.2894	.3417	.304	.323	
144	3	.3683	.0638	.0368	.2099	.5268	.295	.410	
168	3	.2496	.0574	.0331	.1070	.3921	.183	.284	
ทั้งหมด	30	.3083	.1186	.0217	.2640	.3526	.000	.601	
Fixed Effects			.0776	.0142	.2787	.3378			
Random Effects				.0326	.2344	.3821			.0086

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.31 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัสชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	29.447	9	3.272	106.605	.000
Within Groups	.614	20	.031		
ทั้งหมด	30.061	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
24	3	.0000			
36	3	.0000			
48	3	.0000			
72	3	.0000			
96	3	.0000			
120	3	.0000			
168	3	.0000			
0	3		.4331		
12	3			2.303	
144	3				2.6976
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Varlance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.4331	.0601	.0346	.2840	.5822	.364	.473	
12	3	2.3030	.2699	.1558	1.6325	2.9734	1.992	2.475	
24	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
36	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
48	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
72	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
96	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
120	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
144	3	2.6976	.4801	.2772	1.5050	3.8901	2.149	3.041	
168	3	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.000	.000	
ทั้งหมด	30	.5434	1.0181	.1859	.1632	.9235	.000	3.041	
Fixed Effects			.1752	.0320	.4766	.6101			
Random Effects				.3302	-.2037	1.2904			1.0804

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.32 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกรดบิวทิริกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยูคาลิปตัส ชุดทดลองที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 168 ชั่วโมง ด้วยวิธีทางสถิติ

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.050	9	.006	2.189	.069
Within Groups	.051	20	.003		
ทั้งหมด	.102	29			

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan[a]

เวลา (ชั่วโมง)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
72	3	.0424	
168	3	.0438	
12	3	.0477	
120	3	.0598	
144	3	.0644	
96	3	.0795	
48	3	.0922	
24	3	.0936	
36	3	.1103	.1103
0	3		.1858
Sig.		.168	.083

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (ชั่วโมง)	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด	Between-Component Variance
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน			
0	3	.1858	.0273	.0158	.1179	.2536	.163	.216	
12	3	.0477	.0247	.0143	-.0137	.1092	.025	.074	
24	3	.0936	.0515	.0298	-.0345	.2216	.054	.152	
36	3	.1103	.0503	.0291	-.0148	.2354	.064	.164	
48	3	.0922	.0388	.0224	-.0041	.1885	.059	.135	
72	3	.0424	.0575	.0332	-.1005	.1853	.000	.108	
96	3	.0795	.0711	.0411	-.0972	.2561	.000	.137	
120	3	.0598	.0644	.0372	-.1002	.2198	.000	.128	
144	3	.0644	.0487	.0281	-.0567	.1854	.031	.120	
168	3	.0438	.0517	.0299	-.0847	.1723	.000	.101	
ทั้งหมด	30	.0819	.0592	.0108	.0598	.1041	.000	.216	
Fixed Effects			.0506	.0092	.0627	.1012			
Random Effects				.0137	.0510	.1128			.0010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปภาพประกอบการทดลองวิจัย

รูปที่ ค.1 *Clostridium* sp. G10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยการย้อมแกรม

รูปที่ ค.2 โคโลนีของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 บนอาหารแข็ง Reinforced Clostridial Medium (RCM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.3 ตัวอย่างกิ่งยูคาลิปตัสก่อนทำการบด

รูปที่ ค.4 ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการบดให้มีขนาด 70 – 850 µm

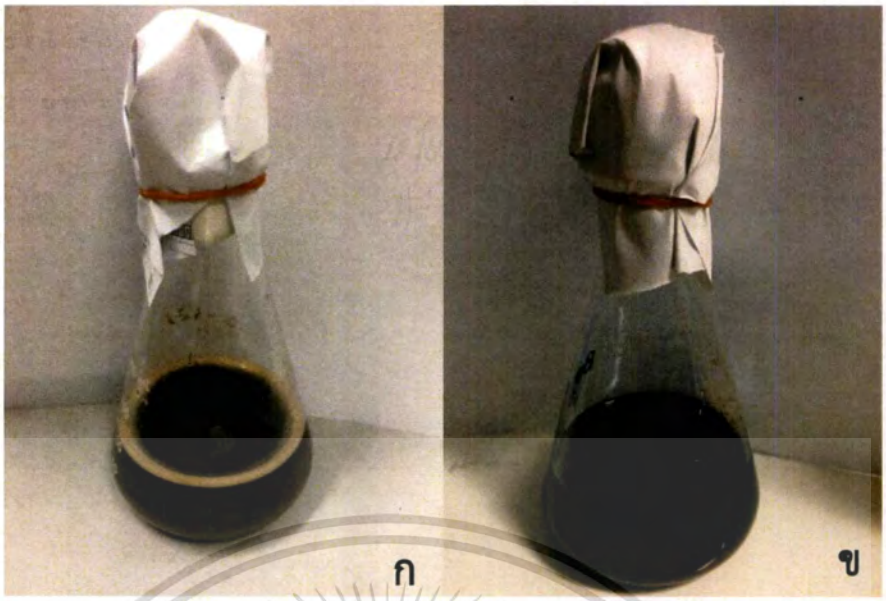
รูปที่ ค.5 ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.6 ตัวอย่างยูคาลิปตัสที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

รูปที่ ค.7 การปรับสภาพตัวอย่างยูคาลิปด้วยสารละลายกรดกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ก: ก่อนการปรับสภาพ, ข: หลังการปรับสภาพ)

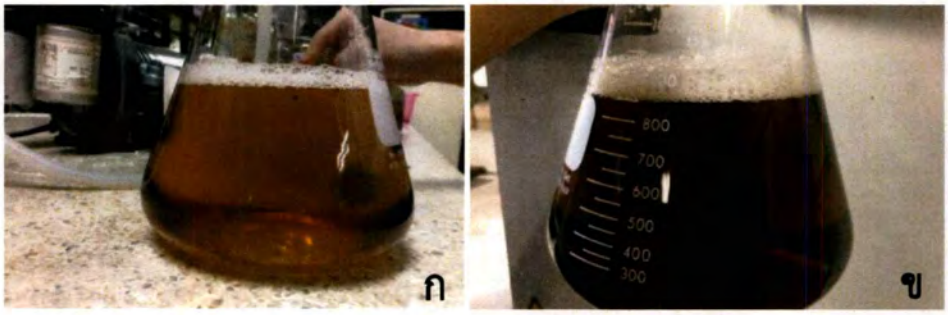
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



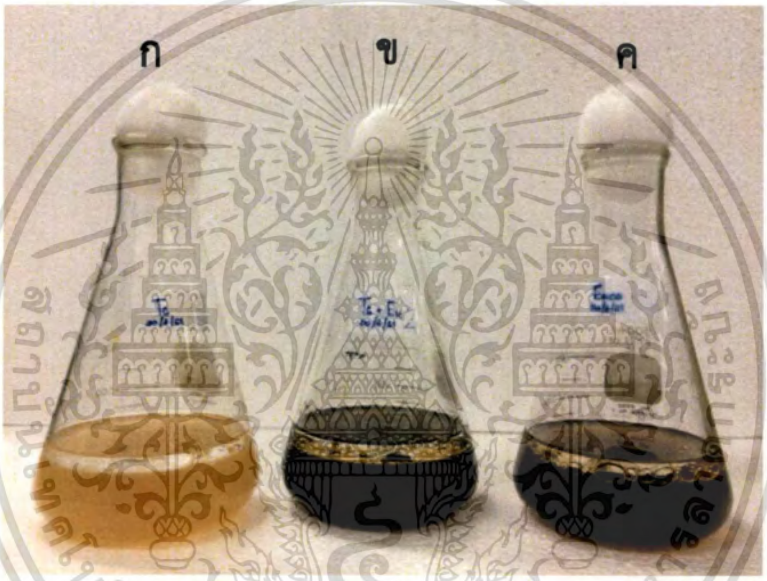
รูปที่ ค.8 การปรับสภาพยูคาลิปด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ก: ก่อนการปรับสภาพ, ข: หลังการปรับสภาพ)

รูปที่ ค.9 การปรับสภาพยูคาลิปด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที (ก: ก่อนการปรับสภาพ, ข: หลังการปรับสภาพ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.10 ส่วนใสที่กรองได้หลักการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE® 1500
(ก: ก่อนต้มระเหยน้ำออก, ข: หลังต้มระเหยน้ำออก)



รูปที่ ค.11 อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 คือ อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส (ก) อาหาร T6 ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารที่ได้จากการย่อยยูคาลิปตัส (ข) อาหารที่เป็นยูคาลิปตัสที่ผ่านการย่อย (ค) โดยทั้งหมดมีความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้