ผลของสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยต่อค่าการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum*

Effect of Inhibitors from Sugarcane Bagasse Hydrolysis on Growth of *Clostridium acetobutylicum*

ณัฐรุจา สุทธิสา

พิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2565

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Inhibitors from Sugarcane Bagasse Hydrolysis on Growth of *Clostridium acetobutylicum*

NATRUJA SUTTHISA

PIPAT PALPRASIT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยต่อค่าการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum*
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ณัฐรุจา สุทธิสา รหัสนักศึกษา 62050488 นาย พิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 62050521
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ผลสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยต่อค่าการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum*

ชื่อนักศึกษา นางสาว ณัฐรุจา สุทธิสา รหัสนักศึกษา 62050488

นาย พิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 62050521

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อดูผลของสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรดเพื่อเป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 โดยดูค่าการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้ค่าที่ได้จากการวัด ความขุ่น น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์และเปรียบเทียบกับชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรดและผ่านถ่านกัมมันต์ซึ่งเป็นการกำจัดสารยับยั้งออก เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งที่มีต่อค่าการเจริญของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เริ่มจากการนำชานอ้อยมาบดและนำมาย่อยด้วยกรด แยกส่วนของแข็งและของเหลวออกจากกัน แล้วนำของเหลวที่ได้ไปปรับพีเอชให้ได้ 6.50-6.80 และกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์หลังกำจัดสารยับยั้งพบว่าความเข้มข้นลดลงไปจาก 35.45 กรัมต่อลิตร เป็น 22.87 กรัมต่อลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 และไฮโดรไลเซตชานอ้อยทั้งก่อนและหลังกำจัด สารยับยั้ง ทำการวิเคราะห์ผลความขุ่น น้ำหนักเซลล์แห้ง พีเอช และน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์นั้นพบว่า การเจริญของเชื้อในอาหาร T6 ทั้งก่อนและกำจัดสารยับยั้งนั้นมีความใกล้เคียงกัน โดยชั่วโมงที่ 119.5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหาร T6 ทั้งก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งอยู่ที่ 1.414±0.305 กรัมต่อลิตร และ 1.095±0.057 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในอาหาร T6 ก่อนและหลังกำจัดอยู่ที่ 46.17±1.96 กรัมต่อลิตร และ 50.70±5.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ชานอ้อย, การย่อยด้วยกรด, สารยับยั้ง, *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Effect of inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysis on growth of *Clostridium acetobutylicum*
Students	Miss Natruja Sutthisa Student ID 62050488
	Mr.Pipat Palprasit Student ID 62050521
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Asst. Prof. Dr. Vorapat Sanguanchaipaiwong

Abstract

The objective of this special project was to investigate the effects of inhibitors from acid hydrolysis of bagasse on the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 by measurement of cell growth. Turbidity, dry cell weight, pH and reducing sugar were measured and compared with acid hydrolysis bagasse and treated with activated carbon for removal of inhibitors. To study the effect of inhibitors on the growth of *Clostridium acetobutylicum*, sugarcane bagasse was milled and hydrolyzed with acid. The aliquote of hydrolyzed liquid was separated and adjusted to pH 6.50-6.80 and the inhibitors w removed with activated carbon. The concentration of reducing sugar decreased from 35.45 g/l to 22.87 g/l after activated carbon treatment. *Clostridium acetobutylicum* was cultured in T6 medium prepared with sugarcane bagasse with and without inhibitor removal. The samples was analyzed for dry cell weight, pH and reducing sugar concentration. The growth of microorganisms in the T6 medium with and without removal of the inhibitor was not significantly different. After 119.5 h of cultivation, dry cell weights from the T6 media with and without removal of the inhibitors were 1.414±0.305 g/l and 1.095±0.057 g/l, respectively, and the reducing sugar concentration obtained from T6 media with and without removal of inhibitors were 46.17±1.96 g/l and 50.70±5.03 g/l, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keywords: sugarcane bagasse, acid hydrolysis, inhibitors, *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้หากขาดผู้ให้การสนับสนุนด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผศ.ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ อย่างห่วงใยตลอดการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้ และยังช่วยตรวจสอบ ช่วยแก้ไขข้อบกพร่อง และเพิ่มเติมในสิ่งที่ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นคณะกรรมการการสอบโครงงานพิเศษให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย และขอขอบคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา ทุกท่านที่ช่วยมอบความรู้ มอบประสบการณ์มากมายจนประสบความสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ การใช้อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นการดำเนินงาน จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา สมาชิกในครอบครัวที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ที่เป็นผู้มอบชีวิต มอบสิ่งที่ดีและมอบโอกาสในการศึกษาเล่าเรียนทำให้มีสติปัญญา มีประสบการณ์ชีวิตมากมาย รวมไปถึงการส่งเสริมและสนับสนุนปัจจัยต่างๆ

ขอขอบคุณ นางสาวสุธินี วีระวงศ์ นักศึกษาชั้นบัณฑิตศึกษา ที่คอยช่วยเหลือและสนับสนุนการทำโครงงานพิเศษนี้ ตลอดระยะเวลาตั้งแต่เริ่มต้นการดำเนิน จนสำเร็จลุล่วง

ขอบคุณเพื่อนร่วมโครงงานพิเศษฉบับนี้ ที่คอยช่วยเหลือซึ่งกันและกันในการทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณทุกความช่วยเหลือจากทุกท่านที่มิได้กล่าวถึงในนี้ ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวถึงได้ทั้งหมด จึงขอขอบคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้ ทางคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าในอนาคตโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจต่อไป

ณัฐรุจา สุทธิสา
พิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขต 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 ชานอ้อย 3
2.2 สารยับยั้ง 4
2.2.1 ที่มาของสารยับยั้ง 4
2.2.2 ฟูแรน 7
2.2.3 กรดอ่อน 8
2.2.4 ฟีนอลิก 8
2.3 การยับยั้ง 8
2.3.1 ฟูแรน 8
2.3.2 กรดอ่อน 8
2.3.3 สารประกอบฟีนอลิก 8
2.4 ถ่านกัมมันต์ 9
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 9
2.5.1 ผลของกรดอ่อนที่ได้จากลิกโนเซลลูโลสต่อการผลิตบิวทานอลด้วย *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้การควบคุมสภาวะพีเอช 9
2.5.2 สารประกอบฟีนอลิก: สารยับยั้งที่ได้จากไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิต 2,3-butanediol ด้วย *Enterobacter aerogenes* 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.5.3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเฟอฟูรัลและ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) โดย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในระหว่างการหมักบิวทานอล 10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 11
3.1 วัสดุอุปกรณ์ 11
3.1.1 ชานอ้อย 11
3.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 11
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 11
3.1.4 สารเคมี 12
3.1.5 อุปกรณ์ 12
3.2 วิธีการดำเนินงาน 13
3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมชานอ้อย 13
3.2.2 การย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 13
3.2.3 การปรับพีเอชชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรด 13
3.2.4 การกำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด 13
3.2.6 การเตรียมหัวเชื้อ 14
3.2.7 การเลี้ยงเชื้อ 14
3.2.8 การวิเคราะห์ทางเคมี 14
3.2.9 การวิเคราะส์ทางสถิติ 15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 16
4.1 การปรับสภาพและการย่อยชานอ้อยด้วยกรด 16
4.2 การกำจัดสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด 16
4.3 การยืนยันสัณฐานวิทยาของ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 17
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 17
4.4.1 ค่าพีเอชหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 17
4.4.2 ค่าความขุ่นหลังการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

4.4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ
Clostridium acetobutylicum JCM 1419 19
4.4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ตลอดการเลี้ยงเชื้อ
Clostridium acetobutylicum JCM 1419 21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 23
5.1 สรุปผลการวิจัย 23
5.2 ข้อเสนอแนะ 23
เอกสารอ้างอิง 24
ภาคผนวก 27
ภาคผนวก ก 28
ภาคผนวก ข 30
ภาคผนวก ค 33
ภาคผนวก ง 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สารยับยั้งที่พบได้ทั่วไปในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสจาก สน วิลโลว์ ข้าวสาลี ชานอ้อย และซังข้าวโพด 5

4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ 17

4.2 การเปลี่ยนแปลงพีเอช จากอาหาร T6 ชุดควบคุม อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง และอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้ง 18

4.4 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เก็บจากตัวอย่างจากอาหารสามชุด 20

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด 21

ก.1 ค่าความขุ่นที่ได้จากตัวอย่างอาหารทั้งสามชุดชั่วโมงที่ 0-119.5..... 29

ข.1 การวิเคราะห์สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 32

ง.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชเฉลี่ยที่ได้อาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119 34

ง.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของพีเอชเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ชั่วโมงที่ 0-119.5 35

ง.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของพีเอชเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผลถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5 36

ง.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0 -119.5 37

ง.5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5 39

ง.6 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5 41

ง.7 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119.5 43

ง.8 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5 45

ง.9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ง.10 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119.5 ชั่วโมง 49

ง.11 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซต ชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5 51

ง.12 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซต ชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ชานอ้อย 3
2.2 สารยับยั้งกลุ่มต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยลิกโนเซลลูโลส 4
4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช อาหาร T6 ชุดควบคุม อาหาร T6 ที่มีไฮโดนไลเซตชานอ้อย
ก่อนกำจัดสารยับยั้ง อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้ง
ด้วยผงถ่านกัมมันต์ 18
4.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด อาหาร T6 ชุดควบคุม
อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง
อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ 20
4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด อาหาร T6 ชุดควบคุม
อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง
อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ 22
ก.1 สีของอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ .. 28
ก.2 กราฟแสดงค่าความขุ่นที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามชุด 28
ข.1 กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) 32
ค.1 เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและคามสำคัญของปัญหา

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol;CAS no. 71-36-3) เป็นที่รู้จักกัน คือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอน อะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล บิวทานอลไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำ สารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน คือเมทานอล (คาร์บอน 1 คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (ชนิกา และคณะ, 2555)

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobe) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในงานวิจัยการศึกษาอย่างกว้างขวาง (ครองขวัญ และคณะ, 2564)

ชานอ้อยเป็นพืชที่มีประโยชน์ในการเพาะปลูกเพื่อผลิตน้ำตาลในหลายประเทศ ในประเทศไทยก็มีการปลูกอ้อยซึ่งมีอยู่ในทุกภาคยกเว้นภาคใต้ ชานอ้อยเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลออกมาในรูปของเศษเยื่อแห้งหลังจากน้ำอ้อยถูกคั้นออก ชานอ้อยเป็นผลิตที่ได้หลังจากการคั้นน้ำอ้อยมีแหล่งของน้ำตาลรีดิวซ์จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีคุณภาพ ชานอ้อยแห้งประกอบด้วยลิกโนเซลลูโลสซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลลูโลส 40-50% เฮมิเซลลูโลส 20-30% และลิกนิน 15-20% เนื่องจากชานอ้อยมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง (Shangdiar และคณะ, 2022) ทำให้สามารถใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จึงต้องมีการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต เช่น ฟูแรน กรดอ่อน และ สารประกอบฟีนอลิกได้ (Almeida และคณะ, 2007) จึงควรมีการกำจัดสารยับยั้ง

ในการใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อจะต้องมีกระบวนการย่อยด้วยกรดเพื่อย่อยโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสและเพิ่มพื้นที่ทำปฏิกิริยาซึ่งทำให้เกิดสารยับยั้ง (Watanabe และคณะ, 2019) ได้แก่ HMF Furfural Acetic acid และ Formic acid (Almeida และคณะ, 2007) โดยสารเหล่านี้จะยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์หรือยืดระยะพัก (lag phase) ออกไป (Ying และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อใช้ประโยชน์จากชานอ้อยในการเป็นวัตถุดิบเพื่อเป็นสับสเตรตสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

1.2.2 เพื่อทราบผลของสารยับยั้งที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เลี้ยงในชานอ้อยก่อนและหลังผ่านถ่านกัมมันต์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

โครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับค่าการเจริญของ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 โดยใช้ชานอ้อยที่ผ่านการย่อยด้วยกรดและชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรดแล้วผ่านถ่านกัมมันต์เพื่อกำจัดสารยับยั้งเป็นสับสเตรต จากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้ซึ่ง ได้แก่ ความขุ่น พีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำตาลรีดิวซ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่ใช้ชานอ้อยเป็นสับสเตรท

1.4.2 ทราบผลของสารยับยั้งที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

1.4.3 ทราบความแตกต่างของค่าการเจริญของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เลี้ยงในชานอ้อยก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผ่านถ่านกัมมันต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชานอ้อย

ชานอ้อย คือ เศษเหลือของลำต้นอ้อยมีลักษณะเป็นเส้นใยที่บีบเอาน้ำอ้อยหรือน้ำตาลออกจากท่อนอ้อยแล้ว เป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล (กลุ่มส่งเสริมอุตสาหกรรมชีวภาพ, มปป)

รูปที่ 2.1 ชานอ้อย

ที่มา : https://www.palangkaset.com/พืชพลังงาน/อ้อยคั้นน้ำ-2/attachment/2-ชานอ้อย (วันที่สืบค้น 14 ธันวาคม 2565)

อ้อย *Saccharum officinarum* จัดเป็นพืชตระกูลหญ้า มีถิ่นกำเนิดที่เกาะนิวกินีในมหาสมุทรแปซิฟิค มีลักษณะภายนอกคือ ลำต้นเป็นข้อปล้องชัดเจนสามารถแตกหน่อได้จากตาของข้อที่อยู่ติดดิน ใบเกิดสลับข้างกัน และมีส่วนกาบใบหุ้มลำต้นไว้ มีระบบรากฝอยที่แข็งแรงสามารถหยั่งลงไปในดินได้ลึก

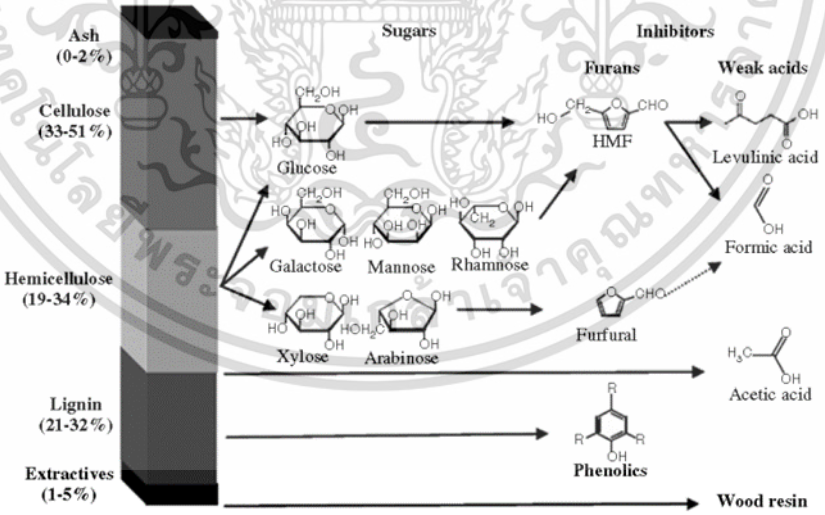
อ้อยนั้นถือเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษกิจโดยในประเทศไทยนั้น อ้อยถูกใช้เป็นวัตถุในการผลิตน้ำตาลโดยปริมาณการผลิตในปีนั้นไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูก และผลผลิตต่อไร่โดยพื้นที่เพาะปลูกจะอยู่ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สารยับยั้ง

2.2.1 ที่มาของสารยับยั้ง

ส่วนประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะมีเปอร์เซ็นต์ที่ต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของพืช การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสก็เพื่อที่จะแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดการตกผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มรูพรุนของลิกโนเซลลูโลสซึ่งจะลดการเสียสภาพทางเคมีของการหมักน้ำตาลซึ่งจำเป็นในการผลิตเอทานอล กระบวนการปรับสภาพพัฒนามาเพื่อใช้กับลิกโนเซลลูโลสที่เหมาะกับการนำไปใช้เชิงพาณิชย์เหมือนกับวิธีใช้กรดเจือจางออกซิเดชันแบบเปียก กับวิธีระเบิดไอน้ำ การปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีนี้ทำให้ได้สารประกอบเป็นช่วงกว้าง D-glucose ได้มาจากการย่อยเซลลูโลสเป็นหลักส่วน D-glucose D-galactose D-mannose D-rhamnose (hexoses) D-xylose และ L-arabinose (pentoses) ก็ได้จากการแตกตัวของเฮมิเซลลูโลส กรดยูโรนิค ได้แก่ d-glucuronic และ 4-O-methylglucuronic acids ต่างก็เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยเฮมิเซลลูโลส ลิกนินเป็นโพลีเมอร์แบบวงแหวนที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยฟีนอลโพรเพนเป็นหน่วยย่อย การปรับสภาพการย่อยอาจทำให้ลิกนินและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเสียสภาพไปเป็นสารยับยั้งสามกลุ่มใหญ่ที่ยับยั้งกระบวนการหมัก 1. Furan derivatives (2-furaldehyde และ 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde) 2. กรดอ่อน (กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก และกรดเลวูลินิก) และ 3. สารประกอบฟีนอลิก (Almeida และคณะ, 2007)

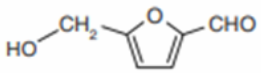
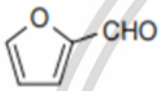
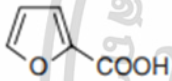
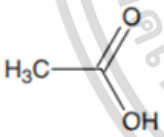


รูปที่ 2.2 สารยับยั้งกลุ่มต่างๆ ที่เกิดจากการย่อยลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Almeida และคณะ (2007)

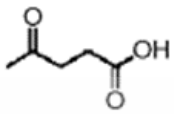
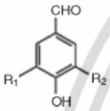
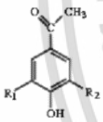
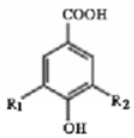
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารยับยั้งที่พบได้ทั่วไปในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสจาก สน วิลโลว์ ข้าวสาลี ชานอ้อย และซังข้าวโพด

กลุ่มสารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	สปรูซ[a,b]	วิลโลว[c]	ข้าวฟ่าง[d]	ชานอ้อย[e]	ซังข้าวโพด[f]
ฟูแรน					
5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) 	5.9[a] 2.0[b]	n.q.	n.i.	0.6	0.06
2-furaldehyde 	1.0 0.5	n.q.	n.i.	1.9	11
2-furoic acid 	n.i.	n.q.	0.007		
กรดอ่อน					
กรดอะซีติก 	2.4	n.q.	1.6	4.4	1.6
กรดฟอร์มิก	3.1 1.6	n.q.	1.4	1.4	

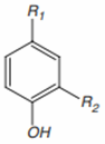
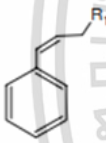
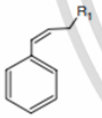
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารยับยั้งที่พบได้ทั่วไปในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสจาก สน วิลโลว์ ข้าวสาลี ชานอ้อย และซังข้าวโพด (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	สปรูซ[a,b]	วิลโลว[c]	ข้าวฟ่าง[d]	ชานอ้อย[e]	ซังข้าวโพด[f]
กรดเลวูลินิก 	0.9 2.6 1.1	n.q.	n.i.		
สารประกอบฟีนอลิก					
4-hydroxybenzaldehyde	n.i.	0.010	0.021		
Vanillin	0.12	0.430	0.032		
syringaldehyde 	0.107		0.024		
4-hydroxyacetophenone	n.i.	n.i.	0.004		
Acetovanillone	n.i.	n.i.	0.008		
Acetosyrigone 	n.i.	n.i.	0.039		
4-hydroxybenzoic acid	0.005 0.039	n.q.	0.010		
Vanillic acid	0.034 0.017	n.q.	0.067		
Syringic acid 	n.i.	n.q.	0.022		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารยับยั้งที่พบได้ทั่วไปในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสจาก สน วิลโลว์ ข้าวสาลี ชานอ้อย และซังข้าวโพด (ต่อ)

กลุ่มสารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
	สปรูซ[a,b]	วิลโลว[c]	ข้าวฟ่าง[d]	ชานอ้อย[e]	ซังข้าวโพด[f]
Phenol	n.i.	0.035			
Cathecol	0.009	0.440			
	0.002				
Hydroquinone	0.017	n.i.			
					
Coniferyl aldehyde	0.035	n.i.			
	0.05				
Acetoguaiacone	0.007	n.i			
Hibbert's ketones	0.146	n.i.			
					
Cinnamic acid	n.i.	n.i.			
	0.001				

วิธีการปรับสภาพ a = ค่าขอบบน จากการปรับสภาพสปรูซแบบ two-step dilute acid, b = ค่าขอบล่าง จากการปรับสภาพสปรูซแบบ one-step dilute acid, c = ปรับสภาพด้วยกรดอ่อน, d = ปรับสภาพฟางข้างด้วย wet oxidation, e = ปรับสภาพชานอ้อยด้วยไอน้ำ, f = ปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยไอน้ำ, n.q. = วัดไม่ได้, n.i. = ไม่พบ

ที่มา: Almeida และคณะ (2007)

2.2.2 ฟูแรน

สารประกอบฟูแรน 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) และ 2-furaldehyde มาจากการดึงน้ำออกจากเฮกโซสและเพนโทสตามลำดับ ระดับของฟูแรนจะต่างกันไปตามแต่ละชนิดของวัตถุดิบและวิธีการปรับสภาพ (ตาราง 2.1) จากตัวอย่างในตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ HMF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของไฮโดรไลเซตสามารถมีได้ตั้ง 2.0 กรัมต่อลิตร ถึง 5.9 กรัมต่อลิตร ในทางกลับกัน HMF จะไม่ถูกพบจากการปรับสภาพข้าวสาลีโดยวิธีระเบิดไอน้ำและจะไม่พบเฟอฟูรัลเมื่อปรับสภาพด้วยวิธี wet oxidation เฟอฟูรัลมักพบที่ความเข้มข้นน้อยกว่า HMF (ตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตามความเข้มข้น ประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ก็มากพอที่จะเกิดการยับยั้งกระบวนการหมักได้ (Almeida และคณะ, 2007)

2.2.3 กรดอ่อน

กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก และกรดเลวูลินิกต่างเป็นกรดอ่อนที่พบได้ทั่วไปในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลส กรดอะซีติกเกิดจากการกำจัดหมู่อะซิทิลของเฮมิเซลลูโลส กรดฟอร์มิกและกรดเลวูลินิกนั้นเกิจากการแตกตัวของ HMF (รูป 2.2) กรดฟอร์มิกสามารถเพิ่มได้จากเฟอฟูรัล ภายใต้สภาวะกรดที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น จำนวนกรดอ่อนในไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลตามลำดับแสดงในตารางที่ 2.1 (Almeida และคณะ, 2007)

2.2.4 ฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกจำนวนมากเกิดจากการแตกตัวของลิกนินและการเสียสภาพของคาร์โบไฮเดรตระหว่างการย่อยด้วยกรด จำนวนและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นกับชนิดของวัสดุ เช่นลิกนินจากวัตถุดิบต่างกันก็จะมีระดับของ methoxylation พันธะภายใน และการเกี่ยวพันที่แตกต่างกันของเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์ (Almeida และคณะ, 2007)

2.3 การยับยั้ง

2.3.1 ฟูแรน

HMF และเฟอฟูรัลจะยับยั้งการเจริญหรือโดยเพิ่มระยะพัก (lag phase) ให้ยาวออกไป โดยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร HMF กับเฟอฟูรัลจะส่งผลร่วมกันแต่เมื่อเปรียบเทียบแล้วที่สภาวะเหมือนกัน HMF จะส่งผลต่อการยับยั้งน้อยกว่าเฟอฟูรัล (Almeida และคณะ, 2007) นอกจากนี้หากมีความเข้มข้นของฟูแรนในช่วง 0.5-11 กรัมต่อลิตร จะสร้างความเสียหายต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซมและยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ในจุลินทรีย์ (Zhang และคณะ, 2012)

2.3.2 กรดอ่อน

กรดอ่อนนั้นสามารถที่จะละลายในไขมันและแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำให้พีเอชภายในเซลล์นั้นลดลง ส่งผลให้การถ่ายทอดโปรตอนและการขนถ่ายสารอาหารลดลง (Cho และคณะ, 2011)

2.3.3 สารประกอบฟีนอลิก

การยับยั้งของสารประกอบฟีนอลิกนั้นมีการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ว่าฟีนอลิกนั้นยับยั้งการเจริญด้วยวิธีการเดียวกันกับฟูแรนโดยสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะยับยั้งได้มากกว่า

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลมาก (Almeida และคณะ, 2007) และสารประกอบฟีนอลิกนั้นยังส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ในการสังเคราะห์กรดอินทรีย์ (Luo และคณะ, 2019)

2.4 ถ่านกัมมันต์

ถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เป็นถ่านที่ผ่านกระบวนการทางเคมีหรือกายภาพเพื่อทำให้เกิดรูพรุนจำนวนมาก ทำให้มีพื้นที่ผิวสูง ถ่านกัมมันต์เป็นตัวกลางที่มีประสิทธิภาพในการดูดติดผิวสูง และการผลิตถ่านกัมมันต์เป็นขั้นตอนที่ใช้เทคโนโลยีที่ไม่ยุ่งยากและมีต้นทุนต่ำ ถ่านกัมมันต์ต่างจากถ่านชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีความพรุนมากกว่า ทำให้ถ่านมีพื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้นโดยทั่วไปจะมีพื้นที่ผิวประมาณ 600–1,500 ตารางเมตรต่อกรัม รูพรุนของถ่านกัมมันต์นี้มีขนาดระหว่าง 2-2,000 นาโนเมตร ทำให้สามารถดูดซับกลิ่นและสีได้มากกว่าถ่านธรรมดา โดยถ่านกัมมันต์จะสามารถมีรูพรุนเพิ่มขึ้นได้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของลิกนินต่อเซลลูโลสในวัตถุดิบ อัตราส่วนของสารกระตุ้นต่อวัตถุดิบ อุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้น อัตราการให้ความร้อน วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตถ่านกัมมันต์นั้นจะต้องมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งวัตถุดิบที่นิยมใช้มักจะเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น ไม้ ขี้เลื่อย ถ่านหิน กะลามะพร้าว กระดูก ชานอ้อย และกากเมล็ดกาแฟ (วราภรณ์, 2559) ผงถ่านกัมมันต์มีโครงสร้างทางกายภาพเป็นรูพรุนในระดับนาโนเมตรจำนวนมาก ซึ่งสามารถใช้ดูดซับสารยับยั้งได้ยิ่งรูพรุนมีขนาดเล็กมากและจำนวนมากก็จะเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับมากยิ่งขึ้น (ฉวีวรรณ, 2562)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.5.1 ผลของกรดอ่อนที่ได้จากลิกโนเซลลูโลสต่อการผลิตบิวทานอลด้วย *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้การควบคุมสภาวะพีเอช (Jianhui และคณะ, 2018)

ผลของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดเลวูลินิกต่อการหมัก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol) ภายใต้การควบคุม pH ที่แตกต่างกัน โดยใช้ *Clostridium acetobutylicum* CH02 พบว่าการเติม $CaCO_3$ ช่วยลดการยับยั้งของกรดฟอร์มิกต่อการผลิต ABE และจากอาหารที่มีกรดฟอร์มิก 0.5 กรัมต่อลิตร เมื่อปรับพีเอชด้วย $CaCO_3$ 11.08 กรัมต่อลิตร และ KOH 1.04 กรัมต่อลิตร แล้ว ABE เพิ่มขึ้นที่ 64.8% และ 6.3% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลการหมักในการหมักในอาหารที่มีกรดอะซีติกและกรดเลวูลินิกและปรับพีเอชด้วย KOH แล้วพบว่า ABE ที่ได้นั้นน้อยกว่าอาหารที่ปรับพีเอชด้วย $CaCO_3$ แต่ถ้าในอาหารมีกรดฟอร์มิก กรดอะซีติก และกรดเลวูลินิกอยู่รวมกันนั้นการปรับพีเอชด้วย KOH นั้นจะดีกว่าการปรับพีเอชด้วย $CaCO_3$ นอกจากนี้ ABE ที่ได้จากอาหารที่มี กรดอะซีติก 2.0 กรัมต่อลิตร กรดฟอร์มิก 0.4 กรัมต่อลิตร และ กรดเลวูลินิก 1 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชด้วย KOH นั้นมากกว่า 12.50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกรดอะซีติก กรดฟอร์มิก และ กรดเลวูลินิกเท่าเท่ากันและปรับพีเอชด้วย $CaCO_3$ ได้ ABE เพียง 3.98 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 สารประกอบฟีนอลิก: สารยับยั้งที่ได้จากไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิต 2,3-butanediol ด้วย *Enterobacter aerogenes* (Lee และคณะ, 2015)

ในการศึกษาการผลิต 2,3- butanediol จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยการย่อยจะเกิดผลพลอยได้ที่ส่งผลต่อการผลิต 2,3-butanediol ซึ่งยังไม่มีการศึกษาเมื่อเทียบกับการศึกษาผลที่มีต่อการผลิตเอทานอล ด้วยเหตุนี้ผลของสารประกอบ (กรดอ่อน ฟูแรน และสารประกอบฟีนอลิก)ที่ได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่อการเจริญของเซลล์,การผลิต 2,3-butanediol และการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต 2,3-butanediol จะใช้ *Enterobacter aerogenes* ATCC 29007 ในงานวิจัยนี้ผลที่ได้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นพิษต่อการเจริญของเซลล์ การผลิต 2,3-butanediol และการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาเป็นฟูแรน และกรดอ่อน นอกจากนี้การผลิต 2,3-butanediol จะใช้วัสดุลิกโนเซลลุโลสจาก มิสแคนทัสเป็นวัตถุดิบในการหมักไฮโดรไลเซตมิสแคนทัสจะได้ 2,3-butanediol 11 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 34.62 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามหากสารประกอบฟีนอลิกมีความเข้มข้นมากกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร ก็จะไม่เกิดการผลิต 2,3-butanediol

2.5.3 การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเฟอฟูรัลและ 5-hydroxymethyl furfural (HMF) โดย *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในระหว่างการหมักบิวทานอล (Zhang และคณะ, 2012)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความทนทานของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักต่อสารยับยั้งฟูแรนแอลดีไฮด์ (เฟอฟูรัลและ 5-hydroxymethyl furfural (HMF)) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแปรรูปไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเชื้อเพลิงและสารเคมี โดยผลของเฟอฟูรัลและ HMF ต่อการผลิตบิวทานอลจะใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในการวัด ผลที่ได้ที่ค่าการเจริญจำเพาะของ *C. acetobutylicum* ที่มีเฟอฟูรัล และ HMF อยู่ในช่วง 15-85% และ 23-78% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าการเจริญจำเพาะที่ไม่มีสารยับยั้งจะเพิ่มขึ้นอีก 8-15% และ 23-38% ตามลำดับ ในการตรวจสอบการเปลี่ยนเฟอฟูรัลและ HMF ไปเป็น furfuryl alcohol และ 2,5-bis-hydroxymethylfuran โดยการเจริญแบบเอกซ์โพเนนเชียลของ *C. acetobutylicum* จะใช้ HPLC และ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงจะอยู่ที่ เฟอฟูรัล 2.13 กรัม และ HMF 0.5 กรัมต่อชั่วโมง การเปลี่ยนสารประกอบฟูแรนไปเป็นสารประกอบที่ส่งผลยับยั้งได้น้อยลงโดย *C. acetobutylicum* อาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไฮโดรไลเซตลิกโนเซลลูโลสไปเป็นบิวทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ชานอ้อย

ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านชายน้ำอ้อยที่ตลาดนัดวีคอนโด เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 29 ตุลาคม 2565

3.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอล 20% ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) นำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ ส่วนอาหารที่จะใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตบิวทานอลจะใช้อาหารสูตร T6 ที่ดัดแปลงมาจาก Tryptone Yeast extract Acetate (Ogata และคณะ, 1973)

3.1.3.1 สูตรอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™)

อาหาร RCM นำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ มีส่วนประกอบต่อน้ำหนึ่งลิตรดังนี้

เคซีนเอนไซมาติคไฮโดรไลเสต (Casein enzymatic hydrolysate)	10 กรัม
สารสกัดเนื้อ (Beef extract)	10 กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
เด็กซ์โตส (Dextrose)	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)	5 กรัม
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	3 กรัม
แป้งที่ละลายน้ำได้ (Starch Soluble)	1 กรัม
แอล-ซีสเตอีน ไฮโดรคลอไรต์ (L-Cysteine hydrochloride)	0.5 กรัม
วุ้น (Agar)	0.5 กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ให้ได้ตามปริมาตรที่กำหนด นำไปละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5±0.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.2 สูตรอาหาร T6 (ดัดแปลงจาก Ogata และคณะ, 1973)

อาหาร T6 ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตบิวทานอล มีส่วนประกอบต่อน้ำหนึ่งลิตรดังนี้

กลูโคส (Glucose)	50 กรัม
ทริปโตน (Tryptone)	6 กรัม
แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate)	3 กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอตเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)	0.5 กรัม
ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride)	0.5 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเตตระไฮเดรต (Magnesium sulphate tetrahydrate)	0.3 กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Ferrous sulphate pentahydrate)	0.1 กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ถ้าหากมีการใช้ไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยชานอ้อยมีการปรับความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยน้ำตาลกลูโคส นำไปปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5±0.2 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.4 สารเคมี

กรดซัลฟิวริก	โซเดียมไฮดรอกไซด์ไตรไฮเดรต
กรดไฮโดรคลอริก	โซเดียมโปแทสเซียมทาเรต
กรด 3,5 ไดนาโตรซาลิก	โซเดียมซัลไฟต์
กลูโคส	ฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์
โซเดียมอะซิเตรท	สารสกัดยีสต์

3.1.5 อุปกรณ์

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)
ปิเปตแก้ว (Pipette)	แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	เครื่องผสมสาร (Vortex)
ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)	ตู้เย็น (Refrigerator)
ไมโครเพลท 96 หลุม (Microwell plate)	ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask)
เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)	บีกเกอร์ (Beaker)
คีมคีบ (Forceps)	ลูกยางดูดสาร (Rubber bulb)
เครื่องกรองสุญญากาศ (Buchner)	ช้อนตักสาร (Spatula)
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	หลอดทดลอง (Test tube)
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	เครื่องบดละเอียด (Hammer mill)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
กระบอกตวง (Cylinder)
กระดาษลิตมัส (Litmus paper)
โถบ่มไร้อากาศ (Anaerobic jar)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
โถดูดความชื้น (Desiccator)
เครื่องชั่งทศนิยม 2,3 และ 4 ตำแหน่ง
กระดาษกรอง
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
เครื่องเขย่า (Shaker)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 ขั้นตอนการเตรียมชานอ้อย

นำชานอ้อยมาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปตากแดดเป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้แห้งสนิท จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปบดด้วยเครื่องบดไม้ยี่ห้อ Retsch® รุ่น SK 100 โดยใช้ใบมีด 1 มิลลิเมตร แล้วนำชานอ้อยที่ผ่านการบดแล้วเก็บใส่ในโถดูดความชื้นเพื่อป้องกันความชื้น

3.2.2 การย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก

กรดที่นำมาใช้ย่อยในชานอ้อย คือ กรดซัลฟิวริกโดยใช้ความเข้มข้น 4% v/v (ครองขวัญ และคณะ, 2564) โดยนำชานอ้อยมา 10 กรัม เติมกรดซัลฟิวริกที่ทำการเจือจางความเข้มข้น 4% โดยเติมลงไป 100 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนจากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสและส่วนที่เป็นตะกอน (ติมากร และคณะ, 2562) นำส่วนใสที่ได้ไปปรับพีเอชเป็น 6.8±0.2 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.2.3 การปรับพีเอชชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรด

การปรับความเป็นค่าพีเอช (pH) ของชานอ้อยที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก โดยการนำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไฮโดรไลเซตชานอ้อยด้วยความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ได้ค่าพีเอช เป็น 6.8±0.2 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ธัญชนก และคณะ, 2563)

3.2.4 การกำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด

นำชานอ้อยที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้วมาวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และนำไปกำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากย่อยเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 โดยใช้ตัวดูดซับ คือ ผงถ่านกำมันต์เพื่อกำจัดสารยับยั้งเนื่องจากสามารถกำจัดสารยับยั้งได้มากที่สุด (ครองขวัญ และคณะ, 2564) โดยนำถ่านกัมมันต์มาผสมเข้ากับไฮโดรไลเซตชานอ้อยนำไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 24 แล้วนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman® No.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ปิเปตเชื้อใส่ลงใน Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) 2 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำทั้งสองหลอดใส่ลงในอาหาร T6 ปริมาตร 180 มิลลิลิตร แล้วใส่ใน Anaerobic jar ที่มี Gaspak™ EZ anaerobe container system แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.7 การเลี้ยงเชื้อ

เติมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่ได้จากข้อ 3.2.6 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลง ในอาหาร T6 ทั้ง 3 แบบ ได้แก่ 1) อาหาร T6 ที่มีน้ำตาลกลูโคส เป็นอาหารชุดควบคุม 2) อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของไฮโดรไลเซตชานอ้อย ที่ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็น 50 กรัมต่อลิตร 3) อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งด้วยถ่านกัมมันต์ ที่ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็น 50 กรัมต่อลิตร ทำการเก็บตัวอย่าง 7 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน โดย 3 วันแรกเก็บ 2 ครั้งและวันที่ 4-5 เก็บวันละครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง วัดพีเอช วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความขุ่น

3.2.8 การวิเคราะห์ทางเคมี

เก็บตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่าง ๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างมาปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำไปวัดความขุ่น 2 มิลลิลิตร วัดด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงยี่ห้อ Thermo Fisher Genesys 10uv (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Rotina รุ่น 380 ที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนใสและตะกอน โดย แบ่งส่วนใสไว้วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และพีเอชด้วยกระดาษลิตมัสยี่ห้อ Merck ส่วนตะกอนนำไปล้างเซลล์โดยเติมน้ำกลั่นลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสและตะกอน เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

นำตัวอย่างที่ได้จากการไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่ผ่านการปรับค่าพีเอช (pH) แล้วนำมาเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำตัวอย่างที่ทำการเจือจาง ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ลงไปปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำให้อุณหภูมิลดลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทใช้ไมโครเวลเพลท (microwellplate) 96 หลุม แล้วคำนวณเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้โดยเทียบจากกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8.2 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บไว้ในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักของหลอดปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ทำการจดบันทึกน้ำหนักไว้และนำตัวอย่างตะกอนที่แยกไว้มาทำการล้างตะกอนเซลล์เพื่อกำจัดน้ำตาลที่เหลือ โดยเติมน้ำกลั่นลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสและตะกอน จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบและเก็บไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นก่อนจะนำไปชั่งน้ำหนักต่อทุก 1 ชั่วโมงจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ และคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในทุกการทดลองทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS (IBM SPSS Statistics) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานและอภิปราย

โครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำชานอ้อยมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเริ่มจากย่อยชานอ้อยด้วยกรดซัลฟิวริก 4% v/v แยกส่วนของแข็งและของเหลวออกจากกัน ได้ของเหลวที่เรียกว่า ไฮโดรไลเซตชานอ้อย จากนั้นทำการปรับพีเอชให้อยู่ที่ 6.8±0.2 และกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ และนำไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับอาหาร T6 และเก็บตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่าความขุ่น พีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลรีดิวซ์

4.1 การปรับสภาพและการย่อยชานอ้อยด้วยกรด

นำชานอ้อยมาล้างและตัดเป็นชิ้นเล็กๆนำไปตากแดดให้แห้งแล้วนำมาบดด้วยเครื่องบด (Hammer mill) ใบมีดขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำชานอ้อยที่ได้มาย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 4% v/v แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นกรองแยกส่วนของแข็งและของเหลวออกจากกัน นำของเหลวที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 9000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากผลการปรับพบว่าพีเอชก่อนและหลังปรับอยู่ที่ 0.4 และ 6.80 ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้อยู่ที่ 35.45 กรัมต่อลิตร

4.2 การกำจัดสารยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการย่อยชานอ้อยด้วยกรด

ชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 4% v/v ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที และปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้เป็น 6.80±0.2 แล้ว นำมากำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยด้วยกรดด้วยผงถ่านกัมมันต์เพื่อเตรียมสำหรับการใช้เป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ค่าพีเอชของไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์อยู่ที่ 6.80 เมื่อหลังผ่านการกำจัดสารยับยั้งด้วยถ่านกัมมันต์แล้วค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 6.80 เป็น 8.50 และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 22.87 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์

ชนิดตัวดูดซับ	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลง (%)
ก่อนผ่านตัวดูดซับ	6.80	35.45	-
ผงถ่านกัมมันต์	8.50	22.87	-35.48

เนื่องจากผงถ่านกัมมันต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.15-0.25 มิลลิเมตร ซึ่งเหมาะกับการใช้งานด้วยการเติมลงในภาชนะของเหลวโดยตรงนอกจากนี้ผงถ่านกัมมันต์ยังมีความละเอียดสูง ซึ่งเพิ่มพื้นผิวของผงถ่านกัมมันต์ให้มากขึ้น ในระหว่างการกำจัดสารยับยั้งน้ำตาลรีดิวซ์ถูกดูดซับไปด้วยทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังกำจัดสารยับยั้งลดลง (ฉวีวรรณ, 2562)

4.3 การยืนยันสัณฐานวิทยาของ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

โครงงานพิเศษนี้ได้ทำการการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในหลอดทดลองที่มีอาหาร Reinforced Clostridial (Difco™) และนำไปหมักใน anaerobic jar ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อมาย้อมสีแกรมและส่องเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, 2559) พบว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เพราะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ดังแสดงใน รูป ค.1

4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 จะเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ในอาหารที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลที่ 50 กรัมต่อลิตร ได้แก่ 1) อาหาร T6 ชุดควบคุม 2) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง 3) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยที่หลังการกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์แล้ว โดยใช้สับสเตรทจากไฮโดรไลเซตซานอ้อย ปริมาตร 180 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ 20 มิลลิลิตร นำไปหมักที่สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ ดังนี้

4.4.1 ค่าพีเอชหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

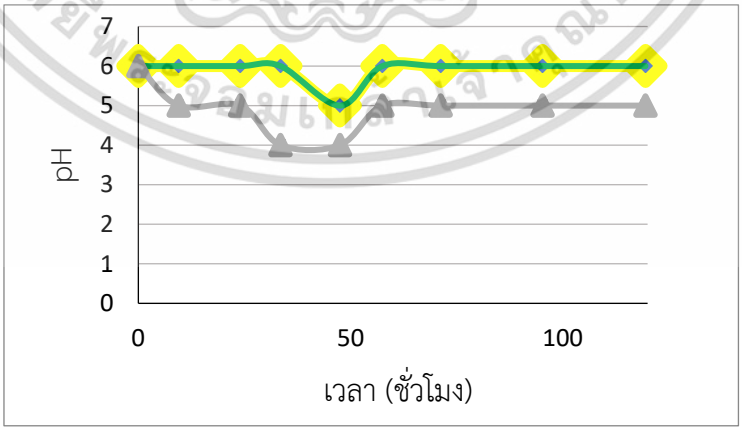
จากการวัดค่าพีเอชจากตัวอย่างที่เก็บที่เวลาต่างๆด้วยกระดาษลิตมัสยี่ห้อ Merck (Litmus paper) พบว่าอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชใดๆแต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 9.5-47.5 ค่าพีเอช ลดลงมาที่ 5 และ 4 ตามลำดับและชั่วโมงที่ 57.5-119.5 ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นและคงที่ที่ 5 อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งและอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชานอ้อยที่หลังการกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่ายกัมมันต์เมื่อวัดค่าพีเอชด้วยกระดาษพีเอชพบว่าชั่วโมงที่ 0-33.5 ค่าพีเอชนั้นคงที่ แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 47.5 พีเอชลดลงมาที่ 5 และในชั่วโมงที่ 57.5-119.5 พีเอชเพิ่มและคงที่ที่ 6 การลดลงของค่าพีเอชที่เกิดขึ้นนี้มาจากสร้างกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมัก ซึ่งเรียกว่า ช่วงการผลิตกรด (acidogenesis phase) ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีค่าพีเอช ลดลง (กัลยาณี, 2562)

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงพีเอช จากอาหาร T6 ชุดควบคุม อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง และอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้ง

ชั่วโมง	ค่าพีเอช		
	อาหาร T6 ชุดควบคุม	อาหาร T6 ก่อนกำจัดสารยับยั้ง	อาหาร T6 หลังกำจัดสารยับยั้ง
0	6	6	6
9.5	5	6	6
24	5	6	6
33.5	4	6	6
47.5	4	5	5
57.5	5	6	6
71.25	5	6	6
95.25	5	6	6
119.5	5	6	6



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช อาหาร T6 ชุดควบคุม ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ( )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุที่ค่าพีเอชลดลงเกิดจากการที่เชื้อมีการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซีติก และกรดบิวทิริก และเชื้อนำกรดกลับเข้าไปใช้อีกครั้งทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น (ครองขวัญ และคณะ, 2564)

4.4.2 ค่าความขุ่นหลังการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

ทำการวัดความขุ่นของตัวอย่างที่เก็บได้จากอาหารทั้งสามชุดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่าที่อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง และอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้ง สีของอาหารทั้งสองชุดนี้มีสีน้ำตาลเข้ม ส่งผลต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงจึงไม่สามารถรายงานผลได้ จึงแสดงในส่วนของภาคผนวก ก

4.4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็นน้ำหนักของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เก็บจากตัวอย่างอาหารสามชุดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที 10 นาที แยกส่วนใสออก แล้วเติมน้ำกลั่นลงและปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที 10 นาที อีกครั้งและเทน้ำออกจะได้ตะกอนเซลล์ นำไปอบ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาเข้าโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก โดยผลที่ได้พบว่าที่อาหาร T6 ชุดควบคุม น้ำหนักเซลล์จะเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 และลดลงในชั่วโมงที่ 33.5 และ 57.5 และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 47.5 และ 71.25-95.25 ที่อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 95.25 และลดลงชั่วโมงที่ 119.5 และ ที่อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่ผ่านการกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ น้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้นถึงชั่วโมงที่ 71.25 และลดลงในชั่วโมงที่ 95.25-119.5 ดังแสดงผลในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.4

น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุมมีมากกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตทั้งก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้ง เกิดจากการที่ไม่ช่วง Lag phase คือช่วงที่เชื้อปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (ครองขวัญ และคณะ, 2564)

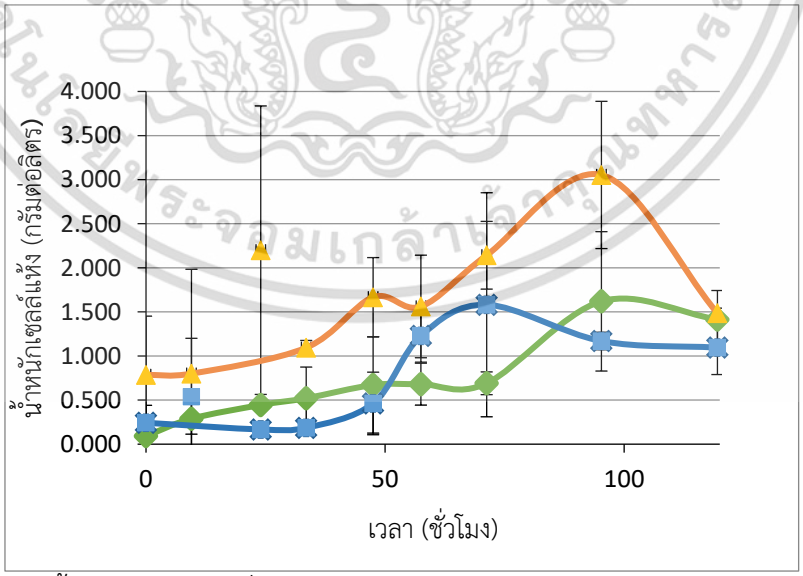
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เก็บจากตัวอย่างจากอาหารสามชุด

ชั่วโมง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	อาหาร T6 ควบคุม	อาหาร T6 ก่อนกำจัดสารยับยั้ง	อาหาร T6 หลังกำจัดสารยับยั้ง
0	$0.786^{a}\pm0.111$	$0.093^{a}\pm0.197$	$0.243^{ab}\pm0.666$
9.5	$0.800^{a}\pm0.175$	$0.289^{a}\pm0.661$	$0.539^{abc}\pm0.662$
24	$2.197^{ab}\pm0.050$	$0.444^{a}\pm0.023$	$0.167^{a}\pm0.167$
33.5	$1.094^{ab}\pm0.353$	$0.521^{a}\pm0.040$	$0.186^{a}\pm0.082$
47.5	$1.667^{ab}\pm0.455$	$0.671^{a}\pm0.354$	$0.462^{ab}\pm0.449$
57.5	$1.562^{ab}\pm0.237$	$0.681^{a}\pm0.298$	$1.229^{bc}\pm0.581$
71.25	$2.143^{ab}\pm0.128$	$0.690^{a}\pm0.129$	$1.581^{c}\pm0.383$
95.25	$3.053^{b}\pm0.790$	$1.620^{b}\pm0.098$	$1.170^{abc}\pm0.834$
119.5	$1.486^{ab}\pm0.328$	$1.414^{b}\pm0.305$	$1.095^{abc}\pm0.057$

หมายเหตุ ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c ในแถวตั้งอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด อาหาร T6 ชุดควบคุม ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ( )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ตลอดการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้จะสามารถบ่งบอกได้ถึงการเจริญเติบโตของเชื้อ หากน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงมากแสดงว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เจริญเติบโตได้มาก แต่ถ้าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงน้อยแสดงว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เจริญเติบโตได้น้อย โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม เริ่มที่ 62.71 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 0 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 6.36 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงที่ 119.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น 13.29 กรัมต่อลิตร

อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 9.5 33.5 47.5 ก่อนจะลงในชั่วโมงที่ 57.5 และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 71.25 และลดลงจนถึง 46.17 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 119.5

อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชั่วโมงที่ 0-24 เพิ่มขึ้นจากนั้นในชั่วโมงที่ 57.5 จึงลดลงก่อนจะเพิ่มอีกครั้งในชั่วโมงที่ 71.25 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 50.70 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 119.5

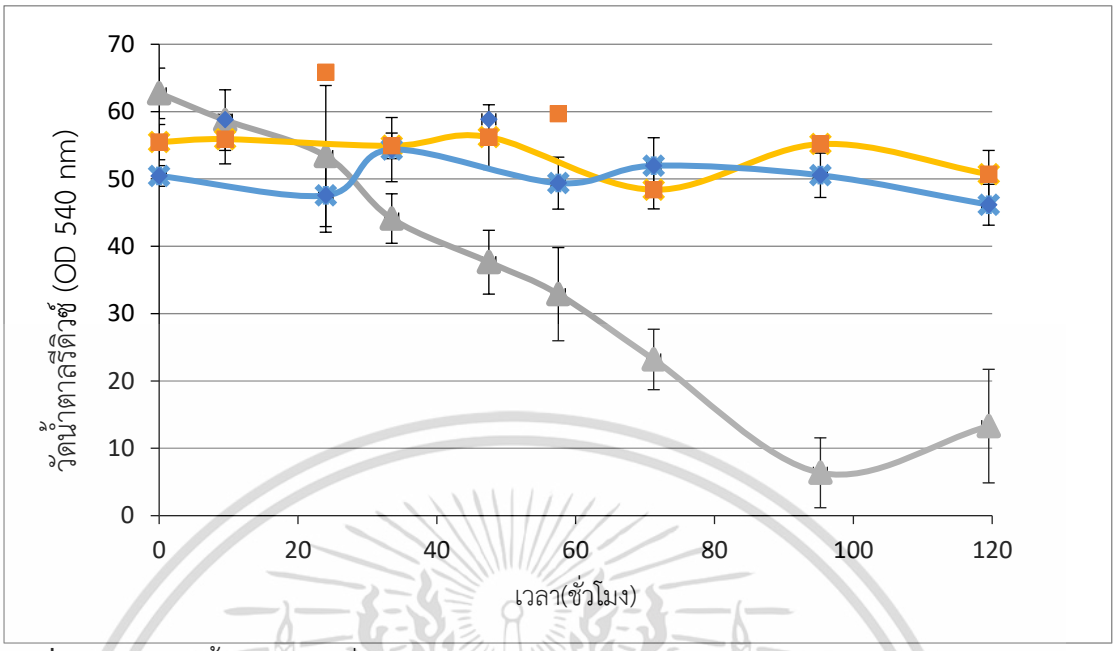
ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด

ชั่วโมง	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	อาหาร T6 ควบคุม	อาหาร T6 ก่อนกำจัดสารยับยั้ง	อาหาร T6 หลังกำจัดสารยับยั้ง
0	62.71^{e}±3.75	50.44^{a}±1.53	55.46^{a}±2.61
9.5	58.73^{e}±4.50	58.81^{a}±5.45	55.91^{a}±3.67
24	53.40^{e}±10.47	47.55^{a}±4.76	65.83^{a}±1.90
33.5	44.12^{d}±3.66	54.35^{a}±3.85	54.35^{a}±4.80
47.5	37.6^{bd}±4.73	58.85^{a}±4.16	56.21^{a}±2.84
57.5	32.88^{cd}±6.91	49.38^{a}±3.29	59.68^{a}±0.30
71.5	23.19^{b}±4.49	51.96^{a}±3.03	48.39^{a}±3.52
95.25	6.36±^{a}5.18	50.54^{a}±5.14	55.17^{a}±1.79
119.5	12.29^{a}±8.43	46.17^{a}±1.96	50.70^{a}±5.03

หมายเหตุ ค่าที่แสดงคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d eในแถวตั้งอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากตัวอย่างอาหารสามชุด อาหาร T6 ชุดควบคุม ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อย หลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ( )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงงานพิเศษนี้ได้ศึกษาการนำชานอ้อยมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เพื่อศึกษาค่าการเจริญเติบโต โดยชานอ้อยที่นำมาใช้จะต้องผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 4% v/v แล้วแยกส่วนใสกับตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้มาปรับพีเอชให้ได้ 6.80 เรียกของเหลวที่ได้นี้ว่า ไฮโดรไลเซตชานอ้อย จากนั้นแบ่งไฮโดรไลเซตชานอ้อยออกเป็นสองส่วน โดยนำอีกส่วนที่แบ่งไปผ่านถ่านกัมมันต์เพื่อกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ซึ่งพบว่าพีเอชของไฮโดรไลเซตชานอ้อยเพิ่มขึ้นจาก 6.80 เป็น 8.50 ปริมาณน้ำตารีดิวซ์ไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนและหลังกำจัดอยู่ที่ 35.45 กรัมต่อลิตร และ 22.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง พีเอช ความขุ่น น้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำตารีดิวซ์ พบว่าไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งและไฮโดรไลเซตชานอ้อยที่หลังการกำจัดสารยับยั้งด้วยถ่านกัมมันต์ มีค่าการเจริญที่น้อยและใกล้เคียงกัน โดยค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากชั่วโมงที่ 119.5 จากทั้งไฮโดรไลเซตก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งอยู่ที่ 1.414±0.32 กรัมต่อลิตร และ 1.090±0.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และปริมาณน้ำตารีดิวซ์ชั่วโมงที่ 119.5 จากทั้งไฮโดรไลเซตก่อนและหลังกำจัดสารยับยั้งอยู่ที่ 46.17±1.96 และ 50.70±5.03 ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไม่สามารถกำจัดสารยับยั้งได้หมด นอกจากนี้ผงถ่านกัมมันต์ยังดูดซับน้ำตาลในไฮโดรไลเซตชานอ้อยทำให้ปริมาณน้ำตาลลดลง รวมถึงทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจึงต้องปรับพีเอชขึ้นจึงต้องปรับพีเอชอีกครั้งด้วยกรดจึงทำให้ปริมาณน้ำตาลเจือจางลง

5.2 ข้อเสนอแนะ

ปริมาณของผงถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในการกำจัดสารยับยั้งใช้ในอัตราส่วนที่ไม่เพียงพอต่อไฮโดรไลเซตชานอ้อย ควรกำหนดอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการใช้กำจัดสารยับยั้ง และในขั้นตอนการนำเชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรที่จะเขย่าให้เชื้อกระจายโดยทั่วก่อนที่จะลงในอาหารและควรทำอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เป็นเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนจึงต้องทำให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์. 2562. “ผลของอาหารสังเคราะห์ (P2 medium) และความเข้มข้นของสารสกัดจากยัสต์ต่อการผลิตไบโอบิวทานอลจากกากน้ำตาล โดย Clostridium beijerinckii TISTR 1461”รายงานการวิจัยทุนอุดหนุนสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคราม

คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. 2559. บทปฏิบัติการจุลชีววิทยา. กรุงเทพ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ครองขวัญ อรุณ, ธัญญ์นรี จิระธรรมวิทย์, วรรณวิษา งามทิพย์, 2564. “การผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 จากชานอ้อยที่ผ่านการย่อยด้วย กรดและกำจัดสารยับยั้ง.” โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ฉวีวรรณ เพ็งพิทักษ์. 2562. ถ่านกัมมันต์. กองเคมีภัณฑ์และผลิตภัณฑ์บริโภค. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์, วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 2555. “ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีที่ 22 ฉบับที่ 3 ก.ย.-3 ธ.ค 2555

ติมากร พิมพิสัย, ปรมี หวาดด้วงดี และพิรญาณ์ นิลอาชา, 2562. “การกำจัดสารยับยั้งในชานอ้อยที่ย่อยด้วยกรดเพื่อการผลิตบิวทานอลโดย *Clostridium sp.*” โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธัญชนก ชัยอำนาจ, พรพรรณ วันสุข, สโรชา แสนสุข และสุดารัตน์ เจริญชัยชนะ, 2553. “การกำจัดสาร ยับยั้งในชานอ้อยที่ผ่านการย่อยด้วยกรด เพื่อเตรียมสารอาหารสำหรับการผลิตบิวทานอล.” โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วราภรณ์ อภิวัฒนาภิวัต . 2559. การดูดซับสีย้อมของถ่านกัมมันต์ที่ผลิตจากเศษไม้. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=26614

อ้อย. มปป. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.palangkaset.com/พืชพลังงาน/อ้อยคั้นน้ำ-2/attachment/2-ชานอ้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F.. 2007. "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*". Chem Technol Biotechnol 82 : 340-349.

Ballongue, J., Masion, E., Amine, J., Petitdemange, H., and Gay, R. 1987. "Inhibitor effect of products of metabolism on growth of Clostridium acetobutylicum". Appl Microbiol Biotechnol 26 : 568-573.

Cao, G.-L., Ren, N.-Q., Wang, A.-J., Guo, W.-Q., Xu, J.-F., and Liu, B.-F. 2010. "Effect of lignocellulose-derived Inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16". International Journal Of Hydrogen Energy 35 : 13475-13480.

Cho, D. H., Shin, S.-J., & Kim, Y. H.. 2012. "Effects of Acetic and Formic Acid on ABE Production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*." Biotechnology and Bioprocess Engineering 17: 270-275.

Lee, S. J., Lee, J. H., Yang, X., Kim, S. B., Lee, J. H., Yoo, H. Y., Park, C. Kim, S. W. 2015. "Phenolic compounds: Strong inhibitors derived from lignocellulosic hydrolysate for 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*". Biotechnology Journal, 10, 1920-1928.

Luo, H., Zheng, P., Bilal, M., Xie, F., Zeng, Q., Zhu, C., Yang, R., Wang, Z. 2020. "Efficient bio-butanol production from lignocellulosic waste by elucidating the mechanisms of *Clostridium acetobutylicum* response to phenolic inhibitors". Science of the Total Environment 710 : 136399.

Ogata, S. and Hongo, M. 1973. "Bacteria lysis of *Clostridium* species. Lysis of *Clostridium* Species by Univalent Cation." *Journal of Genneral Microbiology*. 19 : 251-256.

Shangdia, S., Lin, Y.-C., Ponnusamy, V. K. and Wu, T.-Y. "Pretreatment of lignocellulosic biomass from sugar bagasse under microwave assisted dilute acid hydrolysis for biobutanol production." Bioresource Technology, 2022, P.1.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang, J., Yang, H., Qi, G., Liu, X., Gao, X., & Shen, Y.. 2019. “Effect of lignocellulose-derived weak acids on butanol production by *Clostridium acetobutylicum* under different pH adjustment conditions”. Royal Society Of Chemmistry 1967-1975.

Watanabe, K., Tachibana, S., & Konishi, M. 2019. “Modeling growth and fermentation inhibition during bioethanol production using component profiles obtained by performing comprehensive targeted and non-targeted analyses.” Bioresource Technology. 281 : 260-268.

Zha, Y., Westerhuis, J. A., Muilwijk, B., Overkamp, K. M., Nijmeijer, B. M., Coulier, L., Smilde, A. K. and Punt, P.J. 2014 “Identifying inhibitory compounds in lignocellulosic biomass hydrolysates using an exometabolomics approach” BMC Biotechnology. 14 : 22.

Zhang, Y., Han, B., and Ezeji, T. C. 2012. “Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation”. New Biotechlogy 29(3), 345-351.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

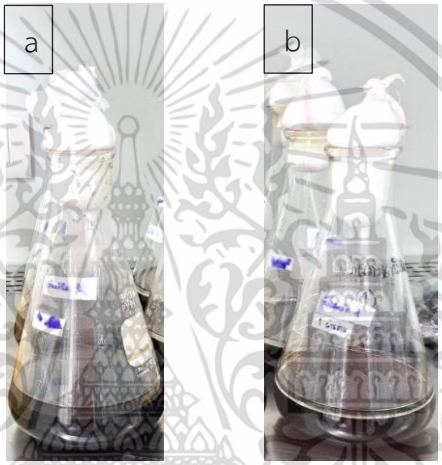
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

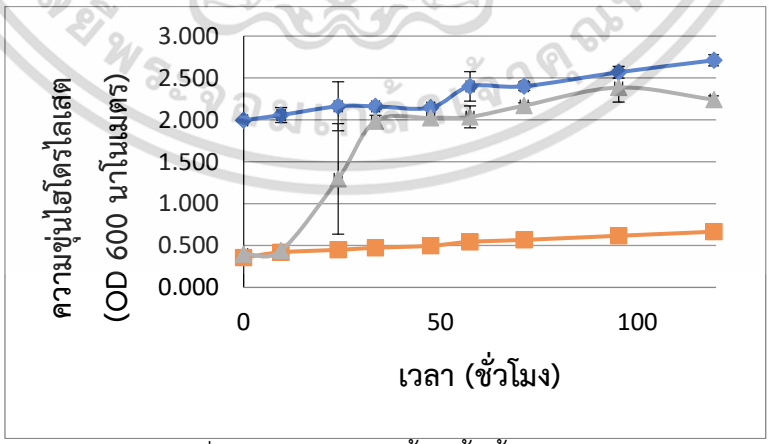
ภาคผนวก ก

ค่าความขุ่นหลังการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

ทำการวัดความขุ่นของตัวอย่างที่เก็บได้จากอาหารทั้งสามชุดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร พบว่าที่อาหาร T6 ชุดควบคุมในชั่วโมงที่ 119.5 มีค่าความขุ่นลดลงเล็กน้อย และพบว่าที่อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ ที่ 24-47.5 ค่าความขุ่นลดลงและเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 57.5-119.5 และอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9.5-119.5 ความขุ่นเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ ก.1 สีของ (a) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ (b) อาหาร T6 ที่มีไฮโดนไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง



รูปที่ ก.2 กราฟแสดงค่าความขุ่นที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสามชุด อาหาร T6 ชุดควบคุม ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ( ) อาหาร T6 ที่มีไฮโดรเซตซานอ้อยที่กำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ ( )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ค่าความขุ่นจากตัวอย่างอาหารทั้งสามชุดชั่วโมงที่ 0-119.5

ชม.	ค่าความขุ่นเฉลี่ย		
	อาหาร T6 ชุดควบคุม	อาหาร T6 ก่อนกำจัดสารยับยั้ง	อาหาร T6 หลังกำจัดสารยับยั้ง
0	0.397^{a}±0.019	1.994^{a}±0.023	0.356^{a}±0.061
9.5	0.440^{a}±0.023	2.057^{a}±0.089	0.419^{ab}±0.057
24	1.295^{b}±0.659	2.162^{a}±0.292	0.449^{abc}±0.042
33.5	1.984^{bc}±0.070	2.161^{a}±0.036	0.473^{bcd}±0.057
47.5	2.023^{c}±0.007	2.146^{a}±0.025	0.497^{bcd}±0.051
57.5	2.036^{c}±0.130	2.400^{b}±0.176	0.544^{cde}±0.052
71.25	2.170^{c}±0.034	2.401^{b}±0.050	0.567^{def}±0.059
95.25	2.386^{bc}±0.173	2.568^{bc}±0.070	0.616^{ef}±0.053
119.25	2.241^{c}±0.044	2.712^{c}±0.066	0.665^{f}±0.065

หมายเหตุ ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a b c d e f ในแถวตั้งอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารสำหรับการย่อยชานอ้อย

กรดซัลฟิวริก

กรดซัลฟิวริกของบริษัท Qrec ที่ความเข้มข้น 98 %

การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก

เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 4 % v/v เตรียมโดยปิเปตกรดซัลฟิวริก 98 % 4.08 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 95.92 มิลลิลิตร

คำนวณหาความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก 4 % v/v จากปริมาตรของกรดที่เติมลงไปได้ดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$98\% \times V_1 = 4\% \text{ X } 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 4.08 \text{ ml}$$

เตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 4 % v/v ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ได้โดยการนำกรดซัลฟิวริก 40.82 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 995.18 มิลลิลิตร โดยคำนวณได้ดังต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$98\% \times V_1 = 4\% \text{ X } 1000 \text{ ml}$$

$$V_1 = 40.82 \text{ ml}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายในการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (ดัดแปลงจากวิธีของ Miller และคณะ, 1959)

การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยชั่ง 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 3,5-Dinitrosalicylic 5 กรัม คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ Magnetic Stirrer และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาเซลเซียส เมื่อเข้ากันเป็นเนื้อ เดียวกันแล้วจึงเติมสารโพแทสโซเดียมตาเตรตลงไปทีละน้อยจนครบ 150 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

นำกลูโคสไปอบในตู้อบลมร้อนใช้อุณหภูมิในการอบ 60 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้กลูโคสไม่มีความชื้น จากนั้นชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตรได้เป็นสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร นำกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ไปทำการเจือจาง ดังนี้ 0 0.1 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมกลูโคสมาตรฐาน

ตัวอย่างในการคำนวณความเข้มข้น

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1\ g/L) \times V_1 = (0.1\ g/L) \times (2\ ml)$$

$$V_1 = 0.2\ ml$$

จะได้ สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร สามารถเตรียมได้โดยใช้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.1 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.2 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.4 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.6 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร

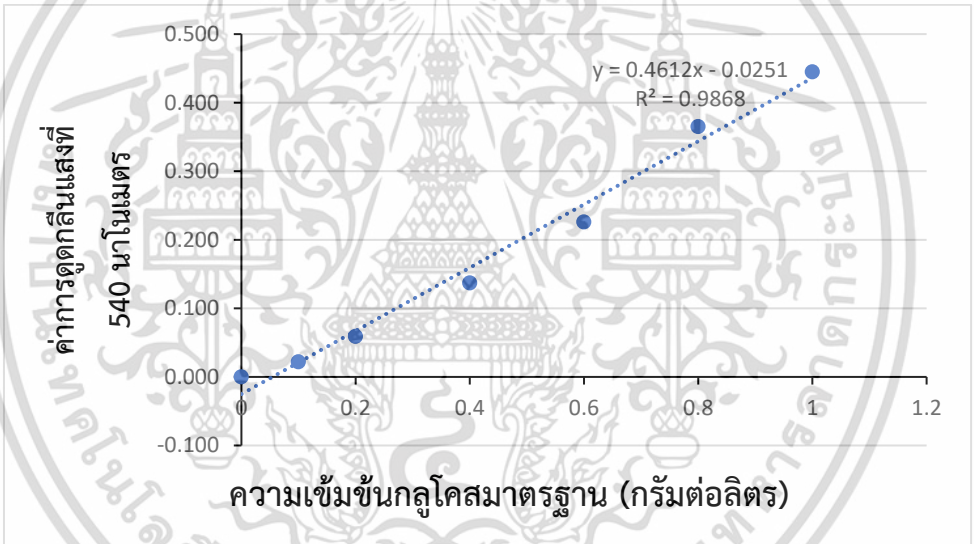
สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.8 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1.0 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้กลูโคส 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร
0	0.000
0.1	0.022
0.2	0.059
0.4	0.137
0.6	0.226
0.8	0.365
1	0.445



รูปที่ ข.1 กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการย้อมแกรมและลักษณะของเชื้อ

ขั้นตอนการย้อมแกรม (คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์. 2559)

1. หยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419
2. ใช้น้ำจากกระบอกล้างสี crystal violet ออก แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ จากนั้นให้ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
3. ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนออกด้วยน้ำและล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 95% หรืออะซีโตนแอลกอฮอล์ ซึ่งทำได้โดยการจับสไลด์ในลักษณะทำมุม 45 องศา จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ 95% ที่ปลายด้านบนสไลด์โดยให้แอลกอฮอล์ไหลผ่านผิวหน้ารอยสเมียร์ จนกระทั่งแอลกอฮอล์ที่ไหลลงมาไม่มีสี (ไม่ควรใช้เวลานานเกิน 20 วินาที) แล้วล้างออกด้วยน้ำทันที
4. ย้อมทับ (counterstain) ด้วยสี Safranin ซึ่งทำได้โดยหยดสี Safranin ลงบนสไลด์ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที
5. ล้างออกด้วยน้ำ แล้วปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศหรือซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ
6. ตรวจผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ทำการสังเกตรูปร่าง สีที่ย้อมติดและการเรียงตัว

รูปที่ ค.1 เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าพีเอชเฉลี่ยที่ได้อาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	6.0000	0.00000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
9.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
24.0	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
33.5	3	4.0000	0.0000	0.00000	4.0000	4.0000	4.00	4.00
47.5	3	4.0000	0.0000	0.00000	4.0000	4.0000	4.00	4.00
57.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
71.25	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
95.25	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
119.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
total	27	4.8889	0.57735	0.11111	4.6605	5.1173	4.00	6.00

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	8.667	8	1.083	-	-
Within Groups	0.000	18	0.000		
Total	8.667	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของพีเอชเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้ง ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
9.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
24.0	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
33.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
47.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
57.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
71.25	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
95.25	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
119.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
total	27	5.8889	0.32026	0.6163	5.7622	6.0156	5.00	6.00

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	2.667	8	0.333	-	-
Within Groups	0.000	18	0.000		
Total	2.667	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.3 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของพีเอชเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตซานอ้อย หลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผลถ่านกัมมันต์ ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
9.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
24.0	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
33.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
47.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	5.0000	5.0000	5.00	5.00
57.5	3	5.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
71.25	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
95.25	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
119.5	3	6.0000	0.0000	0.00000	6.0000	6.0000	6.00	6.00
total	27	5.8889	0.32026	0.6163	5.7622	6.0156	5.00	6.00

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	2.667	8	0.333	-	-
Within Groups	0.000	18	0.000		
Total	2.667	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0 -119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	0.3970	0.01916	0.01106	-1.404739	3.236072	0.3560	1.9940
9.5	3	0.4397	0.02312	0.01335	-1.362335	3.306335	0.4190	2.0570
24.0	3	1.2953	0.65977	0.38092	-0.825717	3.429717	0.4490	2.1620
33.5	3	1.9840	0.07055	0.04073	-0.765208	3.843875	0.4730	2.1610
47.5	3	2.1613	0.03646	0.02105	-0.726607	3.837274	0.4970	2.1460
57.5	3	2.1457	0.02554	0.01475	-0.783078	4.103078	0.5440	2.4000
71.25	3	2.3997	0.17610	0.10167	-0.768680	4.194014	0.5670	2.4010
95.25	3	1.8093	1.07259	0.61926	-0.821381	4.534936	0.6163	2.5680
119.5	3	2.5680	0.07002	0.04043	-0.790287	4.535620	0.6650	2.7117
total	27	1.6889	0.85140	0.1685322	1.140960	1.833806	0.3560	2.71

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	15.588	8	1.948	10.762	0.000
Within Groups	3.259	18	0.181		
Total	18.847	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงคามแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ		
		1	2	3
0	3	0.3970		
9.5	3	0.4397		
24	3		1.2953	
95.25	3		1.8093	1.8093
33.5	3		1.9840	1.9840
57.5	3			2.1457
47.5	3			2.1613
71.25	3			2.3997
119.5	3			2.5680
Sig		0.904	0.076	0.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	1.9943	0.01537	0.00888	1.9561	2.0325	1.98	2.01
9.5	3	2.0573	0.08927	0.05154	1.8356	2.2791	1.98	2.15
24.0	3	2.1623	0.29252	0.16889	1.4357	2.8890	1.99	2.50
33.5	3	2.1613	0.03646	0.02105	2.0708	2.2519	2.12	2.19
47.5	3	2.1457	0.02554	0.01475	2.0822	2.2091	2.12	2.17
57.5	3	2.3997	0.17610	0.10167	1.9622	2.8371	2.28	2.60
71.25	3	2.4013	0.05056	0.02919	2.2757	2.5269	2.35	2.45
95.25	3	2.5680	0.07002	0.04043	2.3941	2.7419	2.50	2.64
119.5	3	2.7117	0.06689	0.03862	2.5455	2.8778	2.64	2.77
total	27	2.2891	0.25583	0.04923	2.1879	2.3903	1.98	2.77

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	1.424	8	0.178	11.552	0.000
Within Groups	0.277	18	0.015		
Total	1.702	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงคามแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ		
		1	2	3
0	3	1.9943		
9.5	3	2.0573		
47.5	3	2.1457		
33.5	3	2.1613		
24	3	2.1623		
57.5	3		2.3997	
71.25	3		2.4013	
95.25	3		2.5680	2.5680
119.5	3			2.7117
Sig		0.152	0.132	0.173

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.6 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	0.3563	0.06145	0.03548	0.2037	0.5090	0.30	0.42
9.5	3	0.4190	0.05766	0.03329	0.2758	0.5622	0.36	0.47
24.0	3	0.4487	0.04215	0.02433	0.3440	0.5534	0.40	0.48
33.5	3	0.4730	0.05704	0.03293	0.3313	0.6147	0.41	0.53
47.5	3	0.4970	0.05174	0.02987	0.3685	0.6255	0.44	0.54
57.5	3	0.5437	0.05279	0.03048	0.4125	0.6748	0.49	0.59
71.25	3	0.5673	0.05958	0.03440	0.4193	0.7153	0.51	0.63
95.25	3	0.6163	0.05320	0.03072	0.4842	0.7485	0.57	0.67
119.5	3	0.6650	0.06578	0.03798	0.5016	0.8284	0.60	0.73
total	27	0.5096	0.10514	0.02024	0.4680	0.5512	0.30	0.73

ตาราง Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	0.231	8	0.029	9.176	0.000
Within Groups	0.057	18	0.003		
Total	0.287	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	0.3563					
9.5	3	0.4190	0.4190				
24	3	0.4487	0.4487	0.4487			
33.5	3		0.4730	0.4730	0.4730		
47.5	3		0.4970	0.4970	0.4970		
57.5	3			0.5437	0.5437	0.5437	
71.25	3				0.5673	0.5673	0.5673
95.25	3					0.6163	0.6163
119.5	3						0.6650
Sig		0.071	0.134	0.071	0.073	0.149	0.057

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.7 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	0.7860	0.66675	0.38495	-0.8703	2.4423	0.03	1.29
9.5	3	0.8000	1.18397	0.68357	-2.1411	3.7411	0.10	2.17
24.0	3	2.1997	1.63580	0.94443	-1.8639	6.2632	0.68	3.93
33.5	3	2.1997	1.63580	0.94443	-1.8639	6.2632	0.68	3.93
47.5	3	1.6667	0.44981	0.25970	0.5493	2.7841	1.40	2.19
57.5	3	1.5620	0.58205	0.33605	0.1161	3.0079	1.16	2.23
71.25	3	1.4283	1.26642	0.73117	-1.7176	4.5743	0.00	2.41
95.25	3	3.0533	0.83483	0.48199	0.9795	5.1272	2.36	3.98
119.5	3	1.4860	0.05700	0.03291	1.3444	1.6246	1.43	1.54
total	27	1.6869	1.11682	0.21493	1.2451	2.1287	0.00	3.98

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	12.343	8	1.543	1.383	0.269
Within Groups	20.086	18	1.116		
Total	32.430	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ = 0.05	
		1	2
0	3	0.7860	
9.5	3	0.8000	
71.25	3	1.4283	1.4283
119.5	3	1.4860	1.4860
57.5	3	1.5620	1.5620
47.5	3	1.6667	1.6667
24	3	2.1997	2.1997
33.5	3	2.1997	2.1997
95.25	3		3.0533
Sig		0.167	0.113

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.8 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	0.0617	0.09494	0.05482	-1.742	0.2975	0.00	0.17
9.5	3	0.2890	0.17508	0.10108	-1.459	0.7239	0.12	0.47
24.0	3	0.4443	0.05095	0.02942	-0.3178	0.5709	0.40	0.50
33.5	3	0.3473	0.39113	0.22582	-0.6243	1.3189	0.00	0.77
47.5	3	0.4477	0.54673	0.31566	-0.9105	1.8058	0.00	1.06
57.5	3	0.6810	0.23723	0.13696	0.0917	1.2703	0.43	0.90
71.25	3	0.6903	0.12877	0.07435	0.3704	1.0102	0.56	0.81
95.25	3	1.6200	0.79019	0.45622	-0.3429	3.5829	1.04	2.52
119.5	3	1.4143	0.32850	0.18966	0.5983	2.2304	1.09	1.74
total	27	0.6662	0.59254	0.11403	0.4318	0.9006	0.00	2.52

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	6.530	8	0.816	5.654	0.001
Within Groups	2.599	18	0.144		
Total	9.129	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ = 0.05	
		1	2
0	3	0.0617	
9.5	3	0.2890	
33.5	3	0.3473	
24	3	0.4443	
47.5	3	0.4477	
57.5	3	0.6810	
71.25	3	0.6903	
119.5	3		1.4143
95.25	3		1.6200
Sig		0.090	0.516

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	0.2427	0.19803	0.11433	-0.2493	0.7346	0.01	0.36
9.5	3	0.5390	0.66155	0.38195	-1.1044	2.1824	0.02	1.28
24.0	3	0.1110	0.09753	0.05631	-0.1313	0.3533	0.00	0.18
33.5	3	0.1237	0.11083	0.06399	-0.1516	0.3990	0.00	0.21
47.5	3	0.4617	0.35477	0.20483	-0.4196	1.3430	0.24	0.87
57.5	3	1.2287	0.29817	0.17215	0.4880	1.9694	0.89	1.43
71.25	3	1.5810	1.27078	0.73368	-1.5758	4.7378	0.11	2.43
95.25	3	0.7800	0.67912	0.39209	-0.9070	2.4670	0.00	1.24
119.5	3	1.0957	0.30551	0.17638	0.3368	1.8546	0.83	1.43
total	27	0.6848	0.68859	0.13252	0.4124	0.9572	0.00	2.34

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	6.562	8	0.820	2.561	0.46
Within Groups	5.766	18	0.320		
Total	12.328	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ		
		1	2	3
24	3	0.1110		
33.5	3	0.1237		
0	3	0.2427	0.2427	
47.5	3	0.4617	0.4617	
9.5	3	0.5390	0.5390	0.5390
95.25	3	0.7800	0.7800	0.7800
119.5	3	1.0957	1.0957	1.0957
57.5	3		1.2287	1.2287
71.25	3			1.5810
Sig		0.076	0.073	0.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.10 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ชุดควบคุม ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	62.9039	0.78258	0.45182	60.9599	64.8480	62.36	63.80
9.5	3	60.8341	6.12699	3.53742	45.6138	76.0543	55.42	67.49
24.0	3	55.6552	10.62947	6.13693	29.2501	82.0602	44.16	65.13
33.5	3	44.7085	3.46626	2.00125	36.0978	53.3191	41.07	47.97
47.5	3	37.3725	1.79140	1.03426	32.9225	41.8226	35.76	39.30
57.5	3	32.7452	6.83970	3.94890	15.7544	49.7359	28.11	40.60
71.25	3	23.2703	4.47135	2.58153	12.1629	34.3778	18.31	26.98
95.25	3	5.5112	3.53687	2.04201	-3.2749	14.2973	2.44	9.38
119.5	3	12.4526	6.64213	3.83483	-4.0473	28.9526	7.51	20.00
total	27	37.2726	20.49357	3.94399	29.1656	45.3796	2.44	67.49

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	10340.119	8	1292.515	40.145	0.000
Within Groups	579.528	18	32.196		
Total	10919.646	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ = 0.05				
		1	2	3	4	5
95.25	3	5.5112				
119.5	3	12.4526				
71.25	3		23.2703			
57.5	3		32.7452	32.7452		
47.5	3			37.3725	37.3725	
33.5	3				44.7085	
24	3					55.6552
9.5	3					60.8341
0	3					62.9039
Sig		0.151	0.056	0.331	0.131	0.151

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.11 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยก่อนกำจัดสารยับยั้งชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	50.4691	0.38946	0.22485	49.5016	51.4366	50.18	50.91
9.5	3	60.8247	5.37139	3.10117	47.4815	74.1680	55.44	66.19
24.0	3	53.0795	5.98602	3.45603	38.2094	67.9496	46.31	57.68
33.5	3	36.3691	31.50900	18.19173	-41.9036	114.6418	0.00	55.44
47.5	3	60.6211	3.85641	2.22650	51.0412	70.2009	56.21	63.37
57.5	3	32.9215	28.58648	16.50441	-38.0913	103.9343	0.00	51.46
71.25	3	51.9256	2.11743	1.22250	46.6656	57.1856	50.63	54.37
95.25	3	33.6985	29.22850	16.87508	-38.9092	106.3061	0.00	52.16
119.5	3	46.2664	0.90605	0.52311	44.0156	48.5171	45.45	47.24
total	27	47.3528	17.84896	3.44081	40.2801	54.4255	0.00	66.19

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	2812.443	8	351.555	1.151	0.379
Within Groups	5498.643	18	305.480		
Total	8311.086	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	**N**	**ระดับนัยสำคัญ = 0.05**
		1
57.5	3	32.9215
95.25	3	33.6985
33.5	3	36.3691
119.5	3	46.2664
0	3	50.4691
71.25	3	51.9256
24	3	53.0795
47.5	3	60.6211
9.5	3	60.8247
Sifg		0.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.12 การวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยที่ได้จากอาหาร T6 ที่มีไฮโดรไลเซตชานอ้อยหลังกำจัดสารยับยั้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ชั่วโมงที่ 0-119.5

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95%		ค่าเฉลี่ยต่ำสุด	ค่าเฉลี่ยสูงสุด
					ขอบเขตล่าง	ขอบเขตบน		
0.0	3	55.4291	1.01134	0.58390	52.9168	57.9414	54.56	56.54
9.5	3	58.7813	5.99488	3.46114	43.8892	73.6734	53.18	65.10
24.0	3	43.6664	37.85	21.85522	-50.3690	137.7019	0.00	67.20
33.5	3	36.6962	31.90683	18.42142	-42.5647	115.9572	0.00	57.89
47.5	3	18.7374	32.45417	18.73742	-61.8832	99.3581	0.00	56.21
57.5	3	39.7877	34.45780	19.89422	-45.8103	125.3856	0.00	59.90
71.25	3	48.5305	2.58036	1.48977	42.1205	54.9405	45.55	50.08
95.25	3	36.7621	31.84281	18.38446	-42.3398	115.8641	0.00	55.75
119.5	3	33.5955	29.23154	16.87684	-39.0197	106.2107	0.00	53.22
total	27	41.3318	25.36970	4.88240	31.2959	51.3677	0.00	67.20

Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	3526.806	8	440.851	0.601	0.765
Within Groups	13207.357	18	733.742		
Total	16734.164	26			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Duncan

ชั่วโมง	N	ระดับนัยสำคัญ = 0.05
		1
47.5	3	18.7374
119.5	3	33.5955
33.5	3	36.6962
95.25	3	36.7621
57.5	3	39.7877
24	3	43.6664
71.25	3	48.5305
0	3	55.4291
9.5	3	58.7813
Sifg		0.131

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 29 เดือน มิถุนายน พ.ศ 2566

ข้าพเจ้า นางสาวณัฐรุจา สุทธิสา รหัสประจำตัว 62050488
นายพิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์ รหัสประจำตัว 62050521

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า
โครงงานพิเศษ เรื่อง
ชื่อภาษาไทย ผลของสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยชานอ้อยต่อค่าการเจริญเติบโตของ
Clostridium acetobutylicum
ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of Inhibitors from Sugarcane Bagasse Hydrolysis on Growth of
Clostridium acetobutylicum
ปีการศึกษา 2565
เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษาฉบับสมบูรณ์แล้ว
โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.39 % หรือโปรแกรม Turnitin -

ลงชื่อ.....ณัฐรุจา สุทธิสา..... ลงชื่อ.....พิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์.....
(นางสาวณัฐรุจา สุทธิสา) (นายพิพัฒน์ ปาลประสิทธิ์)
นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษ
ของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลง
ชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้