สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสเพื่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum*

Optimal Conditions of Cassava Stem Hydrolysis by Amylase and Cellulase for *Clostridium acetobutylicum* Growth

ศิริกัญญา แก้วขุนทศ

สริดา อ่อนน้ำคำ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2566

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OPTIMAL CONDITIONS OF CASSAVA STEM HYDROLYSIS BY AMYLASE AND CELLULASE FOR *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* GROWTH

SIRIKANYA KAEWKUNTOD

SARIDA OONNAMKAM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTIED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRY MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสเพื่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* Optimal Conditions of Cassava Stem Hydrolysis by Amylase and Cellulase for *Clostridium acetobutylicum* Growth
ชื่อนักศึกษา	ศิริกัญญา แก้วขุนทศ รหัสนักศึกษา 63050523 สริดา อ่อนน้ำคำ รหัสนักศึกษา 63050524
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2566

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสเพื่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* Optimal Conditions of Cassava Stem Hydrolysis by Amylase and Cellulase for *Clostridium acetobutylicum* Growth
ชื่อนักศึกษา	ศิริกัญญา แก้วขุนทศ รหัสนักศึกษา 63050523 สริดา อ่อนน้ำคำ รหัสนักศึกษา 63050524
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง ที่เป็นวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรด้วยเอนไซม์เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 โดยนำลำต้นมันสำปะหลังมาปรับสภาพด้วยการละลายลิกนิน และปรับสภาพด้วย Soxhlet extraction ที่ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α - Amylase from *Bacillus licheniformis*) , เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*) และเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase from *Trichodema reesei* aqueous solution) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสม 50 และ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสม 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังคือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้ เมื่อนำลำต้นมันสำปะหลังมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาตร 30 ไมโครลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 16.00 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 36 ชั่วโมง โดยที่เวลานี้ให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 38.25 กรัมต่อลิตร

และในส่วนของการศึกษาปริมาตรของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังคือ 40 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง โดยให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 15.12 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจึงนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JMC 1419 ในขั้นตอนถัดไปโดยเปรียบเทียบอาหาร 2 ชนิดได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เซลลูเลสที่ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงกว่าเท่ากับ 0.084 h^{-1} เมื่อเทียบกับอาหารที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีค่า (μ) เท่ากับ 0.013 h^{-1} แต่อาหารที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังให้ค่าผลผลิตชีวมวลต่อซับสเตรท ($Y_{X/S}$) สูงกว่าเท่ากับ 0.177 กรัม น้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ขณะที่อาหารกลูโคสมีค่า ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.103 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัม น้ำตาลรีดิวซ์แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางเลือกนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวภาพต่างๆ จากการหมัก

คำสำคัญ : ลำต้นมันสำปะหลัง, เอนไซม์อะไมเลส, เอนไซม์เซลลูเลส, การย่อยด้วยเอนไซม์, *Clostridium acetobutylicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimal Conditions of Cassava Stem Hydrolysis by Amylase and Cellulase for *Clostridium acetobutylicum* Growth
Student Name	Ms. Sirikanya Kaewkuntod Student ID 63050523
	Ms. Sarida Oonnamkam Student ID 63050524
Degree	Bachelor of Science (Industry Microbiology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic year	2023
Advisor	Asst. Prof.Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

Abstract

The objective of this research is to study the optimal conditions of the hydrolysis of cassava stems, an agricultural residue, using enzymes, for the growth of *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 The cassava stems were pretreated by delignifying using and Soxhlet extraction with acetone as solvent. Subsequently, enzymatic hydrolysis was conducted using alpha-amylase (α -Amylase from *Bacillus licheniformis*), amyloglucosidase enzyme (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*), and cellulase enzyme (Cellulase from *Trichodema reesei* aqueous solution). The study investigated optimal conditions including temperatures (50 and 60 ° C), incubation period (12, 24, 36, and 48 h), and volumes of cellulase enzyme (20, 30, 40, and 50 μl/g pretreated cassava stem). It has been found that the most suitable incubation temperature for cassava stems was 60 ℃ and incubating with 30 μl cellulase enzyme for 48 h yielded the highest reducing sugar concentration of 16.00 g/L. Regarding the optimal incubation period, thirty six hours provided the maximum reducing sugar concentration of 38.25 g/L. The study also found that cellulase enzyme (40 μl/g pretreated cassava stem) was optimal for hydrolyzing cassava stems, resulting in a reducing sugar concentration of 15.12 g/L. These

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

optimal conditions were utilized for *Clostridium acetobutylicum* JMC 1419 culture medium. The study was compared two types of media: T6 medium containing 45 g/L of glucose (control) and T6 medium containing hydrolyzed cassava stems with maximum reducing sugars and supplemented glucose to 45 g/L equivalent. The study has been found that T6 medium with 45 g/L of glucose had a specific growth rate (μ) of 0.084 h^{-1} greater than that of T6 medium containing hydrolysis cassava stems with μ of 0.013 h^{-1}. However, the cassava stem-based medium had a higher biomass yield coefficient ($Y_{X/S}$) of 0.177 g dry cell weight/g reducing sugars, whereas the glucose based medium obtained $Y_{X/S}$ of 0.103 g dry cell weight/g reducing sugars. This indicated the potential of using cassava stems as an alternative raw material to enhance various bioproduction efficiencies through fermentation.

Keyword : cassava Stem, amylase, cellulase, enzymatic hydrolysis, *Clostridium acetobutylicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำโครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษาด้วยดีเสมอมา คอยให้ความรู้และ แนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆรวมทั้งแนะนำการวางแผนในการปฏิบัติกรต่างๆ จนโครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุลวงมาได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการโครงงานพิเศษและ ผศ.ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุลกรรมการโครงงานพิเศษที่สละเวลามาเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษและคอยให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหา จุดบกพร่องต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษเล่มนี้ออกมาสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่คอยให้คำปรึกษาในการใช้อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการใช้เครื่องมือตลอดจนเทคนิคการทดลองต่าง ๆ นายสมศักดิ์ จำปาทิว ที่คอยให้อำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่ ขอขอบพระคุณ คุณป้าแม่บ้านประจำชั้น 4 และคุณลุงยาม ตึกวิทย์เก่า ที่ดูแลความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษ และขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้ ทางคณะผู้จัดทำขอขอบคุณ นางสาวสุธินี วีระวงศ์ รุ่นพี่ที่คอยสละเวลา ให้คำปรึกษาและให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งยังช่วยในการแก้ไขปัญหา ตั้งแต่เริ่มทำโครงงานพิเศษเล่มนี้จนโครงงานพิเศษเล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณเพื่อนๆ ทั้งในสาขา และต่างสาขา ที่ให้คอยช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ และคอยให้กำลังใจมาตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณทุกคนในครอบครัวที่คอยส่งเสริมการเรียนรู้และสนับสนุนในด้านต่างๆ มาโดยตลอด คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายทั้งการเรียนและค่าใช้จ่ายต่างๆ ในชีวิตประจำวัน และขอขอบคุณตัวข้าพเจ้าและเพื่อนร่วมโครงงานพิเศษ ที่ร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่างๆ มาด้วยกัน และให้ความร่วมมือในการทำโครงงานพิเศษเล่มนี้มาเป็นอย่างดีจนเสร็จสมบูรณ์ ทั้งคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์กับผู้ที่สนใจ และหากโครงงานพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ ที่นี่

ศิริกัญญา แก้วขุนทศ
สริดา อ่อนน้ำคำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญรูป ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 มันสำปะหลัง 4

2.1.1 การจำแนกชนิดของมันสำปะหลัง 5

2.1.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง 7

2.2 อะไมเลส (AMYLASE) 10

2.2.1 แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.1 11

2.2.2 บีตา-อะไมเลส (beta-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.2 11

2.2.3 แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส 11

2.3 เซลลูเลส (CELLULASES) 12

2.3.1 องค์ประกอบและการทำงานของเซลลูเลส 12

2.3.2 เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase 12

2.3.3 เอนไซม์ C_2 หรือ β-1,4 glucanase 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส 13
2.4 *Clostridium acetobutylicum* 14
2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบ 15
2.5.1 การปรับสภาพทางกายภาพ 15
2.5.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี 15
2.5.3 การปรับสภาพทางเคมี 16
2.5.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ 17
2.6 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล 17
2.6.1 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก 17
2.6.2 รูปแบบของกระบวนการหมัก 18
2.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก 18
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 23
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 23
3.1.1 ลำต้นมันสำปะหลัง 23
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ 23
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 23
3.1.4 สารเคมี 25
3.1.5 เอนไซม์ 26
3.1.6 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ 26
3.2 การเตรียมลำต้นมันสำปะหลัง 27
3.3 การปรับสภาพและการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง 27
3.3.1 การละลายลิกนินด้วยอะซิโตน 27
3.3.2 การย่อยด้วยเอนไซม์ 27
3.3.3 การเตรียม hydrolysate ลำต้นมันสำปะหลัง 29
3.4 การเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* 30
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 30
3.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก (Fermentor/ Bioreactor) 30
3.5 การวิเคราะห์ทางเคมี 31
3.5.1 การวิเคราะห์น้ำตาลโดย ใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959) 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง 31
3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ 31
3.6 จลนพลศาสตร์เบื้องต้น 32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 33
4.1 การยืนยันสัณฐานวิทยา 33
4.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 33
4.2 ผลการศึกษาการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ 34
4.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม 34
4.2.2 เวลาที่เหมาะสม 36
4.2.3 ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม 38
4.3 ผลการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในระดับถังหมัก 40
4.3.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 41
4.3.2 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 44
4.3.3 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 47
4.3.5 ผลการศึกษา ค่า pH ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* 50
4.4 จลนพลศาสตร์เบื้องต้น 53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 56
5.1 สรุปผลการทดลอง 56
5.2 ข้อเสนอแนะ 57
เอกสารอ้างอิง 58
ภาคผนวก 64
ภาคผนวก ก ข้อมูลการเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน 65
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 หัวมันสำปะหลัง....4
2.2 ลักษณะรากหรือหัวมันสำปะหลัง....7
2.3 ลักษณะของลำต้นมันสำปะหลัง....8
2.4 ลักษณะใบของมันสำปะหลัง....8
2.5 ลักษณะดอกตัวเมียของมันสำปะหลัง....9
2.6 ลักษณะเมล็ดของมันสำปะหลัง....10
4.1 เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 100 เท่า....33
4.2 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์....35
4.3 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์....38
4.4 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์....40
4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน....42
4.6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์ ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร....43
4.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน....45
4.8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร....46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.9 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....48
4.10 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร.....49
4.11 ค่า pH ที่วัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....51
4.12 ค่า pH ที่วัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร.....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....41

4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....44

4.3 ค่า OD 600 นาโนเมตร ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....47

4.4 ค่า pH ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน.....50

4.5 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเจริญเติบโตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร 2 ชนิด นำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีอัตราเร็วใบพัด 300 rpm, อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และสภาวะไร้ออกซิเจน.....55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันโลกมีการพัฒนาทางอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดความต้องการของพลังงานปิโตรเลียมมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งทำให้ปิโตรเลียมขาดแคลนและราคาของปิโตรเลียมค่อนข้างสูง จากรายงานการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิสที่ผ่านมาเป็นเวลานานหลายศตวรรษตั้งแต่ยุคเริ่มต้นอุตสาหกรรมจนถึงปัจจุบันทำให้เห็นว่าเชื้อเพลิงฟอสซิส มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ก๊าซธรรมชาตินั้นก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เมื่อถูกเผาไหม้สิ่งนี้สามารถนำไปสู่มลพิษทางอากาศ ทำให้เกิดภาวะโลกร้อน (กรมเชื้อเพลิงธรรมชาติ, 2556)และไม่สามารถกลับมาใช้ใหม่ได้ มีความผันผวนของราคาในตลาด เมื่อเกิดความต้องการมากขึ้นมนุษย์จึงคิดค้นหาแหล่งพลังงานทดแทนที่ยั่งยืน เพื่อตอบสนองความต้องการที่มากขึ้นในอนาคต ไบโอบิวทานอลจึงถือว่าเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกที่เหมาะสมและได้รับการพิจารณาว่าเป็นพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซินมากที่สุด (อภิชาติ, 2555) สามารถผลิตได้ในกระบวนการทางชีวภาพ

บิวทานอล หรือ บิวทิลแอลกอฮอล์ มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ บิวทานอลไม่มีสี สามารถติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมด แต่สามารถแยกออกจากน้ำและสารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน (ชนิกา และคณะ, 2555) การผลิตไบโอบิวทานอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ (Anaerobic bacteria) แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอบิวทานอลคือ คลอสทริเดียม (*Clostridium* spp.) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและวงรี สามารถพบได้ในรูปสปอร์กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง น้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพแล้วการหมักเพื่อเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลวเป็นหนึ่งในงานวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ซึ่งบิวทานอล สามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ชานอ้อย กากถั่วเหลือง เปลือกเผือก มันสำปะหลัง ในโครงงานพิเศษนี้เลือกใช้ลำต้นของมันสำปะหลัง เนื่องจากลำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นมันสำปะหลังถือว่าเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ที่มีราคาต่ำ ในลำต้นของมันสำปะหลังมีไฮโดรเจนไซยาไนด์เป็นอันตรายต่อสัตว์เมื่อนำไปผสมกับอาหารสัตว์อย่างไม่ถูกวิธีจะทำให้สัตว์เสียชีวิตได้ ถึงเกิดปัญหาในการจัดเก็บเนื่องจากมีปริมาณที่มากเกิดความต้องการ

โครงงานพิเศษนี้ ผู้จัดทำจึงได้มีแนวคิดที่จะจัดการกับวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตร เพื่อลดปริมาณขยะ ลดต้นทุนในการผลิต ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมและเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือใช้ จึงเลือกลำต้นของมันสำปะหลังซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ในปริมาณมาก มาใช้ในการผลิตไบโอบิวทานอล โดยการปรับสภาพด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลาย คือ อะซิโตน ในการละลายลิกนิน จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เซลลูเลส หาสภาวะที่ทำให้ได้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อเตรียมลำต้นมันสำปะหลังให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
2. เพื่อศึกษาความสามารถของ *Clostridium acetobutylicum* ในการใช้อาหารเพื่อการเจริญเติบโต
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ อุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นของการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เซลลูเลส

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

นำลำต้นมันสำหลังที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มากำจัดลิกนินด้วย Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลาย คือ อะซิโตน จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -Amylase from *Bacillus licheniformis*) , เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*) และเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase from *Trichodema reesei* aqueous solution) ทำการวัดค่าน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) เพื่อหาอุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไป เมื่อได้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดแล้วจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในถังหมักขนาด 1 ลิตร และทำการวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) , วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมลำต้นมันสำปะหลังเพื่อการย่อยเอนไซม์
2. ทราบแนวโน้มความสามารถของ *Clostridium acetobutylicum* ที่ใช้ลำต้นมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยเอนไซม์
3. ทราบสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ, เวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เซลลูเลสต่อการย่อยมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัวชนิดหนึ่งมีชื่อเรียกกันทั่วไปในภาษาอังกฤษว่า แคสซาวา (Cassava) หรือ ทาปิโอก้า (Tapioca) ประเทศแถบแอฟริกา เรียกชื่อ ภาษาฝรั่งเศสว่า แมนิออ (Manioc)

มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ เช่น ประเทศเปรู เม็กซิโก กัวเตมาลา ฮอนดูรัส และบราซิล ซึ่งมีการปลูกมันสำปะหลังมา 3,000 ถึง 7,000 ปีแล้ว ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่นๆ ของโลก โดยชาวโปรตุเกส และสเปน นำมันสำปะหลังจากเม็กซิโก มายังฟิลิปปินส์ ประมาณ ค.ศ.17 และชาวฮอลแลนด์ นำไปยังอินโดนิเซีย ประมาณ ค.ศ.18 มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้นมีอายุอยู่ได้หลายปี การปลูกมันสำปะหลังจะใช้ส่วน ของลำต้นตัดเป็นท่อนปักไปในดิน ตรงบริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นราก ฝอย หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือนรากจะค่อยๆสะสมแป้ง และมีขนาดโตขึ้น เรียกว่าหัวมันสำปะหลัง และจะสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังหลังจาก 6 เดือน ผ่านไปแล้วโดยจะยืดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาที่อยู่ด้านข้างท่อน มันจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2547)

รูปที่ 2.1 หัวมันสำปะหลัง

ที่มา : https://www.thairath.co.th/news/local/central/2737031

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นักวิทยาศาสตร์ได้จัดมันสำปะหลังไว้เป็นหมวดหมู่ ดังนี้ (สุกัญญาและคณะ, 2559)

ORDER: Geraniales or Euphorbiales

CLASS: Dicotyledonea

SUBCLASS: Archichlamydeae

FAMILY: Euphorbiaceae

TRIBE: Manihoteae

GENUS: *Mannihot*

SPECIES : *M.* esculenta

2.1.1 การจำแนกชนิดของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังทั่วโลกมีทั้งหมดประมาณ 150 พันธุ์แต่ละพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันไปโดยสามารถจำแนกตามลักษณะภายนอก ปริมาณของกรดไฮโดรไซยานิกหรืออายุการเก็บเกี่ยว

2.1.1.1 การจำแนกพันธุ์โดยใช้คุณลักษณะภายนอก

มีการใช้ลักษณะภายนอกหลายอย่างช่วยในการจำแนก เช่น สีของใบอ่อน สีก้านใบ สีลำต้น ขนที่ยอดอ่อน ลักษณะทรงต้น หูใบ เช่น ในส่วนของก้านใบพันธุ์ระยอง จะมีก้านใบสีแดง พันธุ์เกษตรศาสตร์ จะมีก้านใบสีเขียวอ่อนหรือสีขาว และห้วยบงจะมีก้านสองสี เนื่องจากห้วยบงเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ระยอง กับพันธุ์เกษตรศาสตร์ นอกจากนั้น รูปร่างของหัว สีของเปลือก และเนื้อจะแตกต่างกันออกไปตามพันธุ์ เป็นต้น (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2547)

2.1.1.2 การจำแนกพันธุ์ตามปริมาณของกรดไฮโดรไซยานิก

โดยแบ่งมันสำปะหลังออกเป็น 2 ชนิดตามปริมาณกรดไฮโดรไซยานิก คือ ชนิดขม (bitter cassava) ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง จะมีปริมาณกรดโฮโดรไซยานิกสูง และ ชนิดหวาน (sweet cassava) มีปริมาณกรดโฮโดรไซยานิกต่ำ (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ชนิดของมันสำปะหลัง

สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์ของมันสำปะหลังที่ปลูกทั่วไปอยู่ 3 กลุ่ม ได้แก่

2.1.2.1 พันธุ์ชนิดหวาน

เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) ต่ำ เป็นพันธุ์ที่ใช้หัวเพื่อการบริโภคได้โดยตรง รสไม่ขม มีทั้งชนิดเนื้อร่วน นุ่มและชนิดเนื้อเหนียว แน่น นิยมนำมาเชื่อม ปิ้ง เผา ไม่มีการปลูกเป็นพื้นที่ใหญ่ ๆ เนื่องจากมีตลาดจำกัด ในประเทศไทยมีพันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ พันธุ์ห้านาที และพันธุ์ระยอง 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตรปรับปรุงขึ้น พันธุ์นี้สังเกตได้ที่ก้านใบมีสี แดงเข้ม ทั้งก้าน และเปลือกของหัวขรุขระ มีสีน้ำตาล หัวมักมีสีออกเหลือง (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2547)

2.1.2.1 พันธุ์ชนิดขม

เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) สูงกว่าชนิดแรก และมีรสขมเนื้อหยาบ ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์หรือใช้หัวมันสดเลี้ยง สัตว์โดยตรง แต่เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งสูง จึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปต่าง ๆ เช่น แป้งมัน มันเส้น มันอัดเม็ด และแอลกอฮอล์ การแปรรูปเป็นอาหารโดยใช้ความร้อน เช่น ตากแดด เผาและต้ม สามารถจะทำให้ไซยาไนด์แตกตัวหมดไป ทำให้รสขมลดลงได้ ในประเทศไทย พันธุ์ชนิดขม เป็นพันธุ์ที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด เพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมนำไปแปรรูป เพื่อผลิตเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมัน และผลิตเอทานอลแอลกอฮอล์ ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 60 ระยอง 72 ระยอง 90 พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ พันธุ์ห้วยบง 60 ห้วยบง 80 ลักษณะประจำพันธุ์นี้ คือ ก้านใบมีสีเขียวอ่อนปนแดง หัวเรียบ มีสีขาว (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2547)

2.1.2.3 พันธุ์ที่ใช้ประดับ

ใช้ปลูกเป็นไม้ประดับตามสถานที่ต่างๆเพื่อความสวยงาม มีชื่อเรียกว่า มันด่าง เนื่องจากใบมีแถบสีขาวและเหลือง กระจายตามความยาวของใบ และยังมีพันธุ์มันป่า ใช้ปลูกเพื่อให้ร่มเงา เป็นไม้พุ่มขนาดกลางถึงใหญ่พบได้แถบ จังหวัดชลบุรี และระยอง (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาลัยเกษตรศาสตร์, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง

2.1.2.1 รากหรือหัว

มันสำปะหลัง มีราก 2 ชนิด คือ รากจริงเป็นแบบรากฝอย และรากสะสมอาหาร ที่เรียกกันทั่วไปว่า หัวรากจริงเป็นระบบรากแบบ adventitious root system รากที่งอกจากท่อนพันธุ์ สามารถงอกได้จาก 3 ส่วนคือ รากจากส่วนเนื้อเยื่อ รากจากส่วนตาและรากจากส่วนรอยหลุดร่วงของใบส่วนหัวของมันสำปะหลัง คือส่วนรากที่ขยายใหญ่เพื่อสะสมอาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ในส่วน parenchyma cell รากสะสมอาหารมีปริมาณแป้งประมาณ 15 – 40 % มีกรดไฮโดรไซยานิก (HCN) หรือ กรดพรัสซิก (prussic acid) ซึ่งมีพิษจะมีอยู่มากในส่วนของเปลือกมากกว่าเนื้อของหัว ลักษณะของรากหรือหัวมันสำปะหลังแสดงในรูปที่ 2.2 (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาลัยเกษตรศาสตร์, 2558)

รูปที่ 2.2 ลักษณะรากหรือหัวมันสำปะหลัง

ที่มา : https://www.pobpad.com/มันสำปะหลัง-มีประโยชน์

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

2.1.2.2 ลำต้น

มันสำปะหลังเป็นไม้เนื้อแข็ง ลำต้นตั้งตรง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ซม.(รูปที่ 2.3) สีของลำต้นแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ส่วนที่อยู่ใกล้ยอดมีสีเขียว ส่วนที่แก่ที่ต่ำลงมาอาจมีสีน้ำเงิน สีเหลือง หรือสีน้ำตาล ความสูงของต้น 1-5 เมตร ขึ้นกับพันธุ์ โดยพันธุ์ที่ไม่แตกกิ่ง ต้นจะสูง ส่วนพันธุ์ที่แตกกิ่งต้นจะสูงน้อยกว่าการแตกกิ่งของมันสำปะหลังจะแตกออกเป็น 2 กิ่ง หรือ 3 กิ่ง กิ่งที่แตกออกจากลำต้นหลักเรียกว่า กิ่งชุดแรก ส่วนกิ่งที่แตกออกจาก กิ่งชุดแรกเรียกว่า กิ่งชัดที่สอง บนลำต้นหรือกิ่งของมันสำปะหลังจะเห็นรอยหลุดร่วงของก้านใบ เรียกว่ารอยแผลใบ ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างก้านใบกับลำต้นหรือกิ่ง ระยะระหว่างรอยแผลใบ 2 รอยต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันเรียกว่าความยาวของชั้น ด้านบนเหนือรอย แผลใบจะมีตา ซึ่งจะงอกเป็นต้นใหม่เมื่อนำท่อนพันธุ์ไปปลูก (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาลัยเกษตรศาสตร์, 2558)

รูปที่ 2.3 ลักษณะของลำต้นมันสำปะหลัง

ที่มา : https://www.sotus.co.th/site/มันสำปะหลังพันธุ์เกษตร/

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

2.1.2.3 ใบ

เป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) (รูปที่ 2.4) การเกิดของใบจะหมุนเวียนรอบลำต้น มีการจัดเรียงตัว ค่อนข้างคงที่แน่นอนคือ 2/5 ก้านใบต่อระหว่างลำต้นหรือกิ่งกับตัวแผ่นใบ ก้านใบอาจมีสีเขียวหรือสีแดง ตัวใบหรือแผ่นใบจะเว้าเป็นหยักลึกเป็นแฉกจำนวนหยักมีตั้งแต่ 3-9 หยัก ที่โคนก้านใบติดกับลำต้นมีหูใบ (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาลัยเกษตรศาสตร์, 2558)

รูปที่ 2.4 ลักษณะใบของมันสำปะหลัง

ที่มา : https://www.palangkaset.com/พืชพลังงาน/ใบมันสำปะหลัง

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.4 ช่อดอกและดอก

มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีช่อดอกเป็นแบบ panicle (รูปที่ 2.5) คือมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่แยกกันอยู่คนละดอกในช่อเดียวกัน ช่อดอกจะเกิดตรงปลายยอดของลำต้นหรือกิ่ง หรืออาจเกิดตรงรอยต่อที่เกิดการแตกกิ่ง

ดอกตัวผู้ มักเกิดบริเวณส่วนปลายหรือยอดของช่อดอก มีก้านดอก กลีบรองดอก หรือกลีบเลี้ยง 5 กลีบ แต่ไม่มีกลีบดอก ภายในดอกมีเกสรตัวผู้ 10 อัน แบ่งเป็น 2 วง ๆ ละ 5 อัน เกสรตัวผู้วงในมีก้านชูเกสรตัวผู้ สั้นกว่าวงนอก

ดอกตัวเมีย มีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ มักเกิดอยู่บริเวณส่วนโคนของช่อดอก ไม่มีกลีบดอก แต่มีกลีบรองดอกหรือกลีบเลี้ยง 5 กลีบ เช่นเดียวกับดอกตัวผู้ ตรงกลางจะเป็นเกสรตัวเมีย รังไข่ มี 3 carpel ภายในแต่ละ carpel มีไข่ อยู่ 1 ใบ ในช่อดอกเดียวกันดอกตัวเมียจะบานก่อนดอกตัวผู้ 7-10 วัน การบานของดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียจะบานในเวลา 11.30-12.30 น. (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาลัยเกษตรศาสตร์, 2558)

รูปที่ 2.5 ลักษณะดอกตัวเมียของมันสำปะหลัง

ที่มา : https://www3.rdi.ku.ac.th/wp-contents/uploads/2015/04/9-61.jpg

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.5 ผลและเมล็ด

หลังการผสมเกสรแล้ว รังไข่ก็จะเจริญเติบโตขยายใหญ่กลายเป็นผลแบบ capsule ขนาดโตเต็มที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ซม. ยาว 1-1.5 ซม. ภายในมี 3 ช่อง แต่ละช่องมีเมล็ด 1 เมล็ด รูปร่างยาวรี มีสีน้ำตาล และมีลายดำ (รูปที่ 2.6) เมื่อแก่จะแตกดีดเมล็ดกระเด็นออกไป (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2558)

รูปที่ 2.6 ลักษณะเมล็ดของมันสำปะหลัง

ที่มา : https://medthai.com/wp-content/.jpg

(สืบค้นวันที่ 20 พฤษภาคม 2567)

2.2 อะไมเลส (Amylase)

เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycoside ในโมเลกุลของสตาร์ช (starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (dextrin) และน้ำตาล (sugar) ไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (maltose) มอโนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (glucose) อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบ ในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (Ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Colon Institute, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

2.2.1 แอลฟา-อะไมเลส (alpha-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.1

เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (starch) และไกลโคเจน (glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลของสตาร์ช และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร (digestive system) ของมนุษย์ และสัตว์เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์นี้ในการไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch hydrolysis) ในขั้นตอนการทำ liquefaction เพื่อลดความหนืดของสารละลายสตาร์ช ภายหลังการเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinization) เพื่อผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส (พิมพ์เพ็ญ และ เกียรติคุณ, 2546)

2.2.2 บีตา-อะไมเลส (beta-amylase) รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.2

เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส (maltose) เอนไซม์นี้ไม่พบในน้ำย่อยของมนุษย์ แต่พบในราแบคทีเรีย เช่น *Bacillus cereus* และพบในผลไม้ระหว่างการสุก (ripe) (พิมพ์เพ็ญ และ เกียรติคุณ, 2546)

2.2.3 แกมมา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส

ชื่อตามระบบ γ-1,4-glucan glucohydrolase รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน (amylopectin) ซึ่ง โมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (non-reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส (glucose) ผลิตได้โดยรา แบคทีเรีย (ผกามาส, 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เซลลูเลส (cellulases)

เอนไซม์เซลลูเลสพบในจุลินทรีย์ทั่วไป ได้แก่ รา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยสีท แต่จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาใช้ย่อยสลายเซลลูโลสและผลิตเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพแม้ว่าเอนไซม์เซลลูเลสทางการค้าส่วนใหญ่จะผลิตโดยเชื้อราแต่ปัจจุบันมีการศึกษาและวิจัยเอนไซม์เซลลูเลสจากแบคทีเรียอย่างกว้างขวาง เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นข้อได้เปรียบของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย คือ มีความเสถียรที่พีเอชในช่วงกว้าง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Lynd และคณะ, 2002; Wilson, 2004)

2.3.1 องค์ประกอบและการทำงานของเซลลูเลส

ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

2.3.2 เอนไซม์ C_1 หรือ hydrogen bondase

ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนย่อนอ่อนลง เพื่อเป็นซับสเตรทของเซลลูเลส

2.3.3 เอนไซม์ C_2 หรือ β-1,4 glucanase

เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลสหรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายซับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้กลุ่มนี้มี 2 ชนิด คือ

2.3.3.1 Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4)

จะทำหน้าที่ ย่อยพันธะ β-glucoside แบบสุ่ม ได้ผลผลิต คือ กลูโคส เซลโลไดรโอส ไม่ย่อยเซลลูโลสไบโอส สามารถย่อยเซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrin), เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว (swollen cellulose), carboxymethy cellulose (CMC), hydroxy-ethyl cellulose (HEC) ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ตัวนี้ใช้ CMC และ HEC เป็นซับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.2 Exon-β-glucoses (1,4-β-D-glycan cellobiohydrolase EC. 3.2.1.91)

เรียกอีกอย่างได้ว่า cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสด้าน non-reducing end สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (crystalline cellulose) หรือย่อยเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble cellulose) เป็นเซลโลเดกซ์ตรินและเซลโลไบโอส ตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้ายอวิเซล (avicel) และ amorphous cellulose เป็นซับสเตรท

2.3.3.3 β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21)

ทำหน้าที่ย่อยเซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (cello-oligosaccharide) ได้กลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือเซลโลเดกซ์ตริน การทดสอบเอนไซม์นี้ ใช้เซลโลไบโอส, *p*-nitrophynyl-β-d-glucoside หรือซาลิซินเป็นสับสเตรท

2.3.2 คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่า เซลลูเลสเป็นไกลโคโปรตีน ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ถึง 60,000 ดาลตัน มีสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการ โคแฟกเตอร์ หรือโลหะอื่นๆในการทำปฏิกิริยา โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นจุลินทรีย์ทนร้อนบางชนิด นอกจากนี้ เอนไซม์เซลลูเลสยังมีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อ pH ในช่วงกว้างประมาณ 4.8-8.0 และคงทนต่อสารเคมีได้ดี สามารถเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และ 4.0 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาหลายปี หรือเก็บโดยวิธี freeze dry หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตน หรือเอทานอล โดยไม่สูญเสียคุณสมบัติ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน ย่อมมีสมบัติแตกต่างกัน (ทิพวรรณ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 *Clostridium acetobutylicum*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะท่อนขนาดอยู่ในช่วง 0.5-1.5 x 1.5-6 ไมโครเมตร เจริญเติบโตได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-47 องศาเซลเซียสและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม สีครีมผิวมันโปร่งแสง ขอบไม่เรียบ เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 μm ย้อมติดสีแกรมบวก สปอร์ทนความร้อนได้ดี สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 120 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ไม่มีรยางค์ (Appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย diaminopimelic acid พบได้ในดิน น้ำเสีย และระบบย่อยของสัตว์ มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง น้ำตาล ให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการหมัก Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) ในสภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและอะซิโตน แต่ถ้าสภาวะไม่เหมาะสมแบคทีเรียจะผลิตผลิตภัณฑ์อะซิโตนและเอทานอลเป็นผลผลิตหลัก (ชนิกาและคณะ, 2565)

อนุกรมวิธานของ *Clostridium acetobutylicum* เป็นดังนี้ (ชนิกาและคณะ, 2565)

Domain: Bacteria

Phylum: Bacillota

Class: Clostridia

Order: Eubacteriales

Family: Clostridiaceae

Genus: *Clostridium*

Species: *Clostridium acetobutylicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบ

การปรับสภาพวัตถุดิบมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดลิกนิน ซึ่งมีสมบัติไปห่อหุ้มหรือเคลือบโครงสร้างของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ลิกนินจึงเป็นเหมือนผนังป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์เข้าไปย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบและลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบสามารถแบ่งออกเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ การปรับสภาพทางกายภาพ การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี การปรับสภาพทางเคมี และการปรับสภาพทางชีวภาพ (สุภาวดี, 2557)

2.5.1 การปรับสภาพทางกายภาพ

การใช้เครื่องมือหรือเครื่องจักรในการหั่น สับ และบด เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและลดขนาดอนุภาคของลิกโนเซลลูโลสนอกจากนี้ยังเป็นการลดผลึกของเซลลูโลสด้วย (Harun และคณะ, 2011) โดยทั่วไปควรลดขนาดวัตถุดิบหลังจากหั่นแล้วให้มีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และให้มีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร หลังจากการบดละเอียดแล้ว พลังงานที่ต้องใช้ในการบดวัตถุดิบขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของชีวมวลที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่วิธีการปรับสภาพทางกายภาพจะใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่นๆด้วย (สุภาวดี, 2557)

2.5.2 การปรับสภาพทางกายภาพร่วมกับเคมี

2.5.2.1 การระเบิดด้วยไอน้ำ (stream explosion) ชีวมวลที่ผ่านการหั่นและบดแล้วจะถูกปรับสภาพต่อด้วยไอน้ำอิ่มตัวที่ความดันสูง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง โดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะพาสคาล (MPa) ไว้ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลงให้เหลือเท่ากับความดันบรรยากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสและการเปลี่ยนรูปลิกนิน เนื่องจากอุณหภูมิสูงและเป็นการเพิ่มศักยภาพในการย่อยเซลลูโลสด้วย ปัจจัยที่มีผลต่อการระเบิดด้วยไอน้ำ ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดของชิ้นชีวมวล (Pejo และคณะ, 2008)

2.5.2.2 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber explosion, AFEX) การทำให้ชีวมวลสัมผัสกับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงในระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นจึงลดความดันลง โดยมีตัวแปร 4 ตัวสำคัญ ในการปรับสภาวะของกระบวนการนี้ให้มีประสิทธิผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ ปริมาณแอมโมเนีย ปริมาณน้ำ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาโดยทั่วไป กระบวนการ AFEX จะใช้แอมโมเนียเหลวปริมาณ 1-2 กิโลกรัมแอมโมเนียต่อกิโลกรัมชีวมวลแห้ง ที่อุณหภูมิ 60-120 องศาเซลเซียส และความดัน 1.72-2.06 เมกะพาสคาล เป็นเวลา 30 นาที (Kumar และคณะ, 2009) กระบวนการนี้สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้มีประสิทธิผลน้อยเมื่อใช้ปรับสภาพชีวมวลที่มีองค์ประกอบของลิกนินสูง เช่น หนังสือพิมพ์ (มีลิกนิน 18-30 %) เศษไม้ (มีลิกนิน 25-35 %) (Cheng, 2009)

2.5.3 การปรับสภาพทางเคมี

2.5.3.1 การปรับสภาพด้วยโอโซน (ozonolysis) โอโซนสามารถย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสได้ เช่น ฟางข้าวสาลี ชานอ้อย หญ้า พืชถั่ว ไม้สน ก๊าซโอโซนเป็นสารออกซิแดนท์ที่ดีสามารถละลายน้ำได้ สามารถเข้าไปทำละลายโครงสร้างของลิกนินและปลดปล่อยสารประกอบที่ละลายน้ำได้และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น กรดอะซิติก กรดฟลอมิก (Balat, 2011) ประสิทธิภาพการย่อยสลายชีวมวลด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการของการปรับสภาพ

2.5.3.2 การปรับสภาพด้วยกรด (acid hydrolysis) กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งเดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อยลิกโนเซลลูโลส แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อน มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมจึงจำเป็นต้องใช้ถังปฏิกิริยาที่ทนทานต่อการกัดกร่อนและมีค่าใช้จ่ายในการคืนสภาพของกรดนั้นสูงมากดังนั้นจึงใช้กรดเจือจางในการปรับสภาพ (Jung และคณะ, 2013)

2.5.3.3 การปรับสภาพด้วยด่าง (alkaline hydrolysis) การใช้ด่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อวัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลส และผลของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุนั้นด้วย (McMillan, 1994) กลไกการทำงานของดังนั้นชื่อว่าจะไปเพิ่มการพองตัวภายในโมเลกุลภายในต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเฮมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสายโซ่ที่เชื่อมต่อภายใน การใช้ด่างเจือจางในวัสดุลิกโนเซลลูโลสมีผลทำให้เกิดการบวมภายในเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ และแยกสายโครงสร้างระหว่างลิกนินและคาร์โบไฮเดรต และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน

2.5.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ

เป็นการ pretreatment ที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลชีพเหล่านี้ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น white-rot, brown-rod และชนิดที่เป็น soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ โดย brown-rod มีบทบาทสำคัญในการย่อยพวกเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot และ soft-rot จะเข้าย่อยสลายพวกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส นอกจากนั้นยังพบว่า ชีวมวลที่ผ่านการ pretreatment ด้วยวิธีนี้ยังให้ก๊าซชีวภาพได้มากกว่าเมื่อนำไป post-treat ต่อด้วยระบบ anaerobic digestion ส่วนเอนไซม์ที่ใช้ย่อยลิกโนเซลลูโลส ตัวอย่างเช่น cellulases, glucuronidase, acetylesterase, feruloylesterase, xylanese, B-xylosidase, lignin peroxidase, manganese peroxidase และ laccase เป็นต้น (อรุณี, 2555)

2.6 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

2.6.1 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า เอบีอี (ABE fermentation) ซึ่งใช้แบคที่เรียในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล เป็นกระบวนการที่รู้จักกันดี และเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่สองซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการ ไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะ C. *acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้งสายพันธุ์ C. *beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน (สุนทรและคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 รูปแบบของกระบวนการหมัก

รูปแบบกระบวนการหมักแบบกะโดยแบคทีเรีย C. *acetobutylicum* ได้ถูกบันทึกไว้ในหลายๆ เอกสาร และเผยแพร่จนเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งประกอบไปด้วย 2 ระยะที่แตกต่างกัน โดยสอดคล้องกันกับกลไกการสร้างผลิตภัณฑ์ 2 ลักษณะ (Jones และ Woods, 1986; Schuste และคณะ, 1998; Badr และคณะ, 2001) ในระยะแรก จะมีการผลิตกรดอินทรีย์ อันได้แก่ กรดบิวทิริคและกรดอะซิติกในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเหตุให้ค่า pH ในน้ำหมักลดลง ช่วงนี้นิยมเรียกว่าช่วงของการผลิตกรดอินทรีย์ หรือ Acidogenesis หลังจากนั้นระยะที่สอง ซึ่งเป็นช่วงของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อันได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นภายหลังจากเริ่มการหมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ในช่วงนี้ค่า pH ของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะมีการนำกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นบางส่วน ระยะที่สองนี้นิยมเรียกว่าระยะของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์หรือ Solventogenesis นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมัก ยังมีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ออกมาตลอดกระบวนการด้วย (สุนทรและคณะ, 2555)

2.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพจากการผลิตกรดอินทรีย์ไปเป็นการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์มีความยุ่งยากซับซ้อน ได้มีการทำการศึกษาค้นคว้ามากมายเพื่อที่จะเข้าใจถึงสาเหตุของปัจจัย ที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งในกระบวนการหมักแบบกะ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous) โดยมุ่งหวังที่จะค้นหาสาเหตุของปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และรักษาสภาวะดังกล่าวไว้ให้ยาวนานที่สุดเท่าที่จะทำได้อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนระยะดังกล่าวก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Lee และคณะ, 2008) ถึงแม้ว่าการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่ๆ ที่มีคุณค่า แต่ก็เป็นที่เข้าใจว่าไม่มีปัจจัยเฉพาะปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์

2.6.3.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น

ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็นสิ่งที่สำคัญในการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลต่ำ (ต่ำกว่า 20 g/L) การหมักจะมุ่งไปสู่ Acidogenesis phase โดยจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อย (Lee และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นสูงๆ (สูงกว่า 60 g/L) กระบวนการจะผลิตตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ได้มากกว่า (Madihah และคณะ, 2001) และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 80 g/ L น้ำตาลจะไม่ถูกหมักซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) ขณะที่ความเข้มข้นสูงถึง 120 g/L กิจกรรมการหมักจะเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อย (Qadeer และคณะ, 1980) ซึ่งอาจเป็นเพราะการขับยั้งของวัตถุดิบ (Substrate inhibition) กลไกการส่งผ่านน้ำตาลยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจนอย่างไรก็ตามเชื่อกันว่าระบบPhosphotransferase ทำให้เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส (Lee และคณะ, 2008) และดูเหมือนว่าการใช้วัตถุดิบอย่างอื่นของ C. *acetobutylicum* ที่เกิดขึ้น จะเกิดขึ้นโดยการส่งผ่าน Proton ผ่าน Membrane สำหรับน้ำตาล Disaccharide เช่น น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลมอลโตส จะถูกย่อยโดย Phosphorylase และ Free glucose ที่ได้สามารถเปลี่ยนไปเป็น Glucose-6-phosphate โดย Hexokinase (Jones และ Woods, 1986)

2.6.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างยิ่ง ซึ่งอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมักโดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบนั้นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 30 ° C และ 33 ° C แต่จะลดลงที่อุณหภูมิ 37 ° C (Jones และ Woods, 1986) ผลที่คล้ายกันนี้ถูกพบในการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) โดย Mcneil และ Kristiansen (1985) เมื่อทำการทดลอง Mcneil และ Kristiansen พบว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญและการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในการหมักแบบกะของ *C. acetobuylicum* คือผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม (Total solvent yield) มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพราะการลดลงของการผลิตอะซิโตน และพบว่าบิวทานอลจะไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิในรูปของผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวม และอัตราการผลิต ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ 35 ° C

2.6.3.3 ออกซิเจน

C. *acetobutylicum* ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ (Obligate anaerobe) การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหมักที่มีความต่างศักย์ของ Redox (Redox potential) ในช่วงระหว่าง -250 mV ถึง -400 mV การสัมผัสกับออกซิเจนในการหมักแบบไร้อากาศไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดขึ้นเพียงระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40-60 mM) การใช้น้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง การเจริญ การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีนจะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ (Aerobic condition) จุลินทรีย์จะมีการผลิต Butylate แต่ไม่ผลิต Acetate หรือมีการผลิตลดลง รวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วย ซึ่งผลของออกซิเจนคือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมด การเจริญและเมแทบอลิซึม (Mctabolism) จะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้อากาศอีก (Jones และ Woods, 1986)

2.6.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้ายในน้ำหมัก pH จะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่า ถ้ารักษาค่า pH ของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นกรดอินทรีย์ ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษาค่า pH ไว้ที่ค่าต่ำๆ ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงของ pH ที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงกว้างมาก ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วย ช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์มักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 (Lee และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม อย่าง C. *acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วง pH 6.5 (Jones และ Woods, 1986) กรดอินทรีย์อ่อน (Weak organic acid) เช่น กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ของปฏิกิริยา โดยธรรมชาติแล้วจะเป็นพิษต่อเซลล์และสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในรูปที่ไม่แตกตัว ที่ความเข้มข้นของกรดสูงๆ ค่า pH ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลงซึ่งเป็นสาเหตุในการขับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ ภายในตัวเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าจะมีการสะสมของกรดและการลดลงของค่า pH จึงทำให้อัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดชะงักในที่สุด ถึงแม้ว่าการใช้วัตถุดิบและเมแทบอลิซึมของเซลล์ยังคำเนินต่อไป (Zhu และ Yang, 2004) ดังนั้นจึงมีข้อเสนอว่าจุดที่เปลี่ยนเป็น Solventogenesis ก็คือกลไก Detoxification ของเซลล์เพื่อกำจัดผลที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งเมื่อกรดในขั้นตอนสุดท้ายมาถึงระดับช่วงที่มีพิษ (Hatarnis และคณะ, 1984; Long และคณะ, 1984) โดยทั่วๆ ไปการเริ่มต้นของ Solventogenesis จะเกิดขึ้นร่วมกันขณะที่ pH ของสารอาหารมีค่าต่ำและมีกรดในรูปที่ไม่แตกตัวอยู่ในช่วงวิกฤต (Lee และคณะ, 2008) ดังนั้นความเข้มข้นของ Butylate จะต่ำที่ค่า pH ต่ำ (Jones และ Woods, 1986) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าผลของ pH เป็นผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากความเข้มข้นของกรดบิวทริกที่ไม่แตกตัวและสิ่งนี้เป็นปัจจัยควบคุมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อภิชัย (2555) ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับยีสต์ที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 การทดลองได้ทำการศึกษาผลของการควบคุมค่า pH ที่ แตกต่างกันในช่วง pH 4.5-6.5 รวมทั้งทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในช่วง 20-80 g/L ตลอดจนศึกษาผลของการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันที่มีต่อการผลิตตัว ทำละลายอินทรีย์จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย C. *acetobutylicum* TISTR 1462 สามารถใช้ แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

จิราพรรณ และคณะ (2561) ได้ทำการศึกษาการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลด้วยสารที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองแยกเปลือกด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส อะไมโลกลูโคซิเดส เพคติเนส และเซลลูเลส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.183 กรัมต่อกรัมกากถั่วเหลือง และนำสารที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มาเสริมในอาหาร T6 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 50 กรัมต่อลิตรด้วยน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีปริมาณบิวทานอลและเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 1.64 และ 0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในการผลิตตัวทำละลายบิวทานอล และเอทานอลได้

อิศรา และคณะ (2556) ได้ทำกาศึกษาการเปลี่ยนต้นปาล์มมันเก่าที่โค่นทิ้งนำมาผลิตเป็นไบโอบิวทานอล โดยใช้ *Clostridium* spp. น้ำยางจะถูกใช้โดยตรง ในขณะที่เส้นใยของลำต้นจะถูกไฮโดรไลซิสให้เป็นน้ำตาลที่หมักได้ ก่อนใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731ที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอลจากน้ำยางที่สุด โดยไม่เติมสารอาหาร ได้ปริมาณสูงสุด 14.4 กรัมต่อลิตร จากน้ำยาง (ความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร) โดยมีปริมาณผลผลิตบิวทานอล 0.35 กรัมต่อกรัม ส่วนเส้นใยจากลำต้นถูกไฮโดรไลซิสเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือก (ความเข้มข้นของน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ *Clostridium bejjerincki* TISTR 1461 ให้ปริมาณบิวทานอลสูงสุด 10.0 กรัมต่อลิตร โดยมีผลผลิตบิวทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอล 0.41 กรัมต่อกรัม แสดงให้เห็นว่าต้นปาล์มน้ำมันเป็นสารตั้งต้นที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้สำหรับการผลิตไบโอบิวทานอล

วรลักษณ์ (2556) ศึกษา 2 กระบวนการหลัก คือ กระบวนการปรับสภาพและย่อยแกนข้าวโพดซึ่งเปรียบเทียบระหว่างการใช้สารเคมีและการใช้เอนไซม์ และกระบวนการหมักซึ่งเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* YSC2 สำหรับการปรับสภาพและย่อยด้วยสารเคมี ทำการศึกษาการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1-2.5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50-80 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง และย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 - 2 โดยมวล ที่อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง พบสภาวะที่เหมาะสม คือ การปรับสภาพด้วยสารละลายด่าง 2.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และย่อยด้วยสารละลายกรดร้อยละ 0.5 โดยมวล อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 12.420 กรัมต่อลิตร และสำหรับการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ ทำการศึกษาการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสร้อยละ 0.05-0.2 โดยมวล อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส เวลา 60-240 นาที และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ร้อยละ 0.05-0.2 โดยมวล อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส เวลา 240-480 นาที พบสภาวะที่เหมาะสม คือ การปรับสภาพด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ร้อยละ 0.2 โดยมวล อุณหภูมิ 87.6 องศาเซลเซียส เวลา 150 นาที และย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ร้อยละ 0.13 โดยมวล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 360 นาที ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 13.251 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลของการใช้เอนไซม์ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้สารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ลำต้นมันสำปะหลัง

ลำต้นมันสำปะหลังที่ได้จากเกษตรกรที่ตัดส่วนหนึ่งของลำต้นที่ไม่ใช้แล้วออก ของเกษตรกรในพื้นที่ หมู่ที่ 11 ตำบลโคกว่าน อำเภอละหานทราย จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งเป็นช่วงเก็บเกี่ยวมันสำปะหลัง ในเดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2566

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุนทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เป็นเชื้อ freeze dried ทำการถ่ายเชื้อและเก็บในอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

กระตุ้นเชื้อด้วย Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน จากนั้นนำมาเตรียมหัวเชื้อด้วยอาหารสูตร T6 ที่ดัดแปลงมาจาก Tryptone Yeast extract Acetate (Ogata และ คณะ, 1973)

3.1.3.1 สูตรอาหารสำเร็จ Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™)

มีส่วนประกอบต่อน้ำหนึ่งลิตรดังนี้

เปปโทน (Peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เด็กซ์โตส (Dextrose)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	5	กรัม
แป้งที่ละลายน้ำได้ (Soluble Starch)	1	กรัม
ซีสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine HCl)	0.5	กรัม
โซเดียมอะซีเตต (Sodium Acetate)	3	กรัม
วุ้น (Agar)	0.5	กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จ RCM 38 กรัม แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร และปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 $\pm$ 0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3.2 สูตรอาหาร T6

ดัดแปลงจากอาหาร Tryptone Yeast extract Acetate (Ogata และ คณะ, 1973) มีส่วนประกอบต่อน้ำหนึ่งลิตรดังนี้

กลูโคส (Glucose)	45	กรัม
ทริปโตน (Tryptone)	6	กรัม
แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate)	3	กรัม
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)	0.5	กรัม
ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride)	0.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมซัลเฟตเตตระไฮเดรต (Magnesium sulphate tetrahydrate)	0.3	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Ferrous sulphate pentahydrate)	0.1	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ ทั้งหมด แล้วนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร และปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ง เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3.3 สูตรอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร

นำเปลือกลำต้นมันสำปะหลังย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มาปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (วิธีการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS อยู่ในหัวข้อ 3.5.1) ต่อมาเติมส่วนประกอบของอาหาร T6 และทำการเติมกลูโคสรวมกับน้ำตาลรีดิวซ์ใน hydrolysate ให้ได้เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร มาละลายด้วยไฮโดรเสตของลำต้นมันสำปะหลัง ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร และทำการปรับค่า pH ให้เป็น 6.8 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.4 สารเคมี

กรดอะซีติก (Acetic acid)	อะซิโตน (Acetone)
กลูโคส (Glucose)	โพแทสเซียมโซเดียวทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate)
โซเดียมอะซิเตต(Sodium acetate)	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
Parafin Oil	กรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5-dinitrosalicylic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 เอนไซม์

แอลฟา-อะไมเลส (α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ของ บริษัท Sigma)

อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ของ บริษัท Sigma)

เซลลูเลส (Cellulase from *Trichoderma reesei* ของ บริษัท Sigma)

3.1.6 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

กระบอกตวง (Cylinder)

ขวดก้นกลม (Round Bottom Flask)

ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

คิวเวตต์ (Cuvette)

คีมคีบ (Forceps)

เครื่องชั่งทศนิยม 2, 3 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องบดละเอียด (Hammer mill)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องผสมสาร (Vortex)

เครื่องสกัดซอกเลต (Soxhlet)

จานเพาะเชื้อ (Plate)

ช้อนตักสาร (Spatula)

ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

โถดูดความชื้น (Desiccator)

แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

บีกเกอร์ (Beaker)

ปิเปตแก้ว (Pipette)

ลูกยางดูดสาร (Rubber bulb)

ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

หลอดกระดาษ (Thimble)

หลอดทดลอง (Test tube)

หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องไมโครเพลททรีดเดอร์ (Microwell reader) ตู้เย็น (Refrigerator)

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

ถังหมัก (Fermentor/ Bioreactor) และ อุปกรณ์ ไมโครเวลเพลท 96 หลุม (Microwell plate)

Anaerobic Jar และ GasPak

3.2 การเตรียมลำต้นมันสำปะหลัง

หั่นเป็นท่อนขนาดประมาณ 30 เซนติเมตร แล้วนำไปตากให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นหั่นท่อนมันสำปะหลังแห้งเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 2.5 เซนติเมตรด้วยมีดปังตอ ก่อนนำไปบดหยาบ แล้วจึงนำไปบดด้วยเครื่องบด (Retsch SK100) โดยใช้ใบมีดขนาด 1.00 มม. และเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (Desiccator)

3.3 การปรับสภาพและการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง

3.3.1 การละลายลิกนินด้วยอะซิโตน

นำลำต้นมันสำปะหลังที่บดแล้ว 10 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman® No.1 125 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอด thimble ครั้งละ 3 ห่อ นำไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet extractor โดยเติมอะซิโตน 250 มิลลิลิตร ทำการสกัด 12 รอบต่อ 1 ครั้ง ทำเรื่อย ๆ จนครบทั้งหมด 800 กรัม

3.3.2 การย่อยด้วยเอนไซม์

3.3.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง โดยวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดมาศึกษาในการหาสภาวะอื่นๆ ต่อ โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด

ชุดการทดลองที่ 1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

อัตราส่วนของลำต้นมันสำปะหลังที่จะใช้ย่อยเป็น ของแข็ง 1 กรัมต่อของเหลว 10 มิลลิลิตร โดยเตรียมลำต้นมันสำปะหลังดังหัวข้อ 3.3.1 จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.67 มิลลิลิตร เพื่อให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.06 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 30 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ไม่มีตะกอนมาทำการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) เพื่อเปรียบเทียบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยในชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ เมื่อได้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง จากนั้นก็นำไปเข้าสู่ชุดการทดลองที่ 2 ต่อไป

ชุดการทดลองที่ 2 เวลาที่เหมาะสม

อัตราส่วนของลำต้นมันสำปะหลังที่จะใช้ย่อยเป็น ของแข็ง 1 กรัมต่อของเหลว 10 มิลลิลิตร โดยเตรียมลำต้นมันสำปะหลังดังหัวข้อ 3.3.1 จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมน้ำ 9.67 มิลลิลิตร เพื่อให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.06 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 30 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่เหมาะสม (ชุดการทดลองที่ 1) โดยจะเก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ไม่มีตะกอนมาทำการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) เพื่อเปรียบเทียบหาเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยในชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ เมื่อได้เวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง จากนั้นก็นำไปเข้าสู่ชุดการทดลองที่ 3 ต่อไป

ชุดการทดลองที่ 3 ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม

อัตราส่วนของลำต้นมันสำปะหลังที่จะใช้ย่อยเป็น ของแข็ง 1 กรัมต่อของเหลว 10 มิลลิลิตร โดยเตรียมลำต้นมันสำปะหลังดังหัวข้อ 3.3.1 จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.67 มิลลิลิตร เพื่อให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.06 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร (ความเข้มเข้น 20, 30, 35 และ 40 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) ตามลำดับ นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่เหมาะสม (ชุดการทดลองที่ 1) เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม (ชุดการทดลองที่ 2) นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ไม่มีตะกอนมาทำการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมที่ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยในชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าอุณหภูมิ เวลา และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสจากชุดการทดลองทั้ง 3 ที่เหมาะมาใช้ในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอมไซม์ เพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

3.3.3 การเตรียม hydrolysate ลำต้นมันสำปะหลัง

การย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เพื่อเตรียมไปทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 อัตราส่วนของลำต้นมันสำปะหลังที่จะใช้ย่อยเป็น ของแข็ง 120 กรัมต่อของเหลว 1,200 มิลลิลิตร จะปรับปริมาตรตามขวดแก้ว Duran 250 มิลลิลิตร ใส่ของเหลวสูงสุดเพียง 100 มิลลิลิตรเท่านั้น ดังนั้นอัตราส่วนของลำต้นมันสำปะหลังที่จะใช้ย่อยเป็น ของแข็ง 10 กรัมต่อของเหลว 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมลำต้นมันสำปะหลังดังหัวข้อ 3.3.1 จากนั้นเติมเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 30 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมน้ำให้ครบ 1,200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 13.3 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 0.6 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 350 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง) (ชุดการทดลองที่ 3) นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่เหมาะสม 60 องศาเซลเซียส (ชุดการทดลองที่ 1) เป็นเวลาที่เหมาะสม 36 ชั่วโมง (ชุดการทดลองที่ 2) นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ไม่มีตะกอนมาทำการวัดความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (3, 5-Dinitrosalicylic acid) เพื่อยืนยันค่าน้ำตาลรีดิวซ์อีกรอบ จากนั้นนำลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ไปเป็นอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป

3.4 การเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum*

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

ถ่ายเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 เพาะเลี้ยงในอาหาร RCM 2 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร โดยแต่ละหลอดนำเชื้อปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหาร RCM ที่มีปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องปิดด้วยน้ำมันพาราฟิมออยล์ (Parafin Oil) และนำไป heat shock ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปิดด้วยน้ำมันพาราฟินออยล์ (Parafin Oil) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เทใส่ในอาหาร T6 ปริมาตร 54 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อ สุดท้ายจึงนำไปบ่มในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ปริมาณ 60 มิลลิลิตร มาใส่ลงในอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก (Fermentor/ Bioreactor)

หลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร โดยหมักปริมาตร 600 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะ เช่น ความเร็วของรอบใบพัด 300 rpm อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในถัง จากนั้นใส่อาหารที่เตรียมไว้ที่จะใช้ แล้วเปิดแก๊สไนโตรเจนไล่อากาศก่อนเติมหัวเชื้อ และเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง, ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ OD 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.5.1 การวิเคราะห์น้ำตาลโดย ใช้วิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสและส่วนตะกอน ให้นำตัวอย่างส่วนใสมาวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยเจือจางตัวอย่างส่วนใสให้ได้ความเข้มข้นที่ 10 50 และ 100 จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็นจนอุณหภูมิลดลง เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่อง vortex และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ จากนั้นทำการคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ โดยทำการเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

3.5.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

ก่อนนำไปใส่ตัวอย่างทำการอบแห้งหลอดปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำหลอดปั่นเหวี่ยงมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง พร้อมบันทึกผล จากหัวข้อ 3.5.1 นำตัวอย่างส่วนตะกอน มาล้างตะกอนเซลล์โดยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดน้ำตาลที่เหลือออก จากนั้นนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักคงจะคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำอย่างต่ำ 3 ซ้ำ และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ T-test ในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และวิเคราะห์ตาราง ANOVA ค่าความแปรปรวนที่ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีของ Duncan ในการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของผลการเพาะเลี้ยง และการหาระยะเวลาและปริมาตรที่เหมาะสมต่อการบ่มด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 จลนพลศาสตร์เบื้องต้น

คำนวณค่าพารามิเตอร์จลนศาสตร์ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ , h^{-1}) และค่าผลได้ของเซลล์ ($Y_{s/s}$, g/g) โดยใช้สมการดังนี้

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ $\mu = \frac{\mathrm{Inx(max)} - \mathrm{Inx(0)}}{\mathrm{t(0)} - \mathrm{t}}$ โดยคำนวณจากระยะ exponential เท่านั้น

ค่าผลได้ของเซลล์ $Y_{x/s} = (x_{max} - x_0) / (s_0 - s)$

เมื่อค่า x_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)

x_{max} คือ ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด (กรัม/ลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

s_0 คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัม/ลิตร)

s คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เวลาเดียวกับที่ความเข้มข้นเซลล์สูงสุด (กรัม/ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

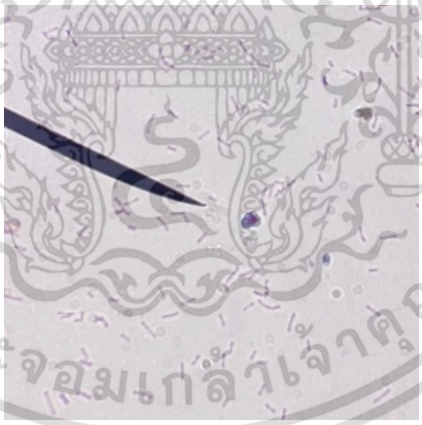
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การยืนยันสัณฐานวิทยา

4.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

จากการศึกษาโครงงานพิเศษในครั้งนี้ โดยได้ทำการเพาะเลี้ยงชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่เป็นเชื้อ freeze dried ลงในอาหารเหลว Reinforced Clostridial Medium (RCM, Difco™) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน จากนั้นนำเชื้อไปย้อมแกรม (Gram stain) และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อดูลักษณะรูปร่าง และการติดสีของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* หลังจากที่ทำการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet)



รูปที่ 4.1 เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 100 เท่า

จะเห็นได้ว่าลักษณะรูปร่างของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM มีรูปร่างเป็นท่อน โดยจะมีการสร้างสปอร์ ซึ่งลักษณะที่ผู้วิจัยพบตรงกับงานวิจัย Patakova และคณะ (2013) ที่กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) และสามารถผลิตบิวทานอลได้ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) และสามารถสร้างสปอร์ (spore-forming)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

4.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

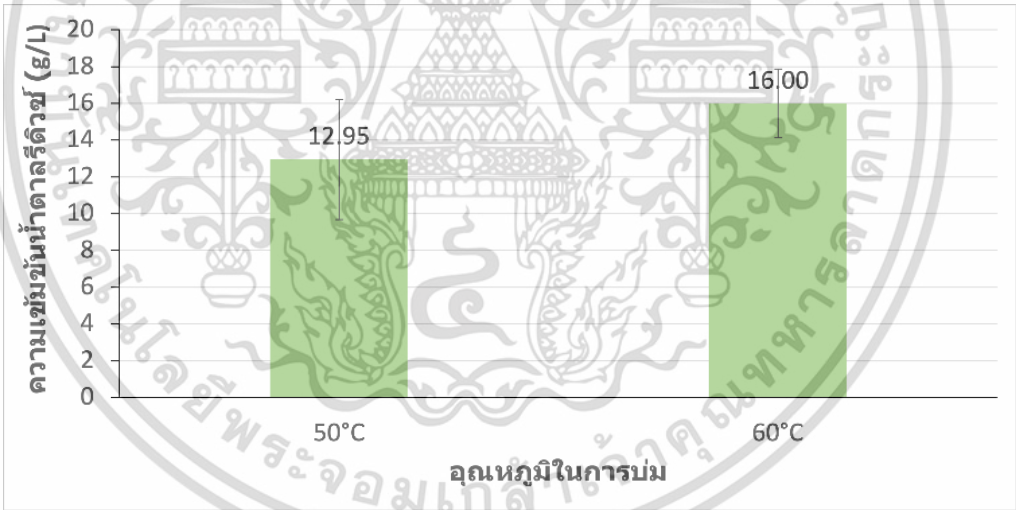
ในการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* และเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส โดยกำหนดใช้เวลาอยู่ที่ 48 ชั่วโมง และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการย่อยสูงถึง 14.34 กรัมต่อลิตร แต่ในทางกลับกันที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยกำหนดใช้เวลาอยู่ที่ 48 ชั่วโมง และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลังเช่นกัน มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 11.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แสดงผลดังรูปที่ 4.2

วรลักษณ์ (2556) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด โดยแปรผันสภาวะในการปรับสภาพและเปรียบเทียบการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์ และกระบวนการหมักโดยใช้ยีสต์ขนมปังและยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดซัลฟูริก พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 2.5 โมลาร์ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 12.42 กรัมต่อลิตร สำหรับการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส สภาวะที่เหมาะสมคือ แอลฟาอะไมเลส 0.20 เปอร์เซ็นต์ ที่ 87.60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที และกลูโคอะไมเลส 0.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 นาที ให้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ 13.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าวิธีทางเคมี การหมักด้วยยีสต์ขนมปัง 8 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.12 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 7.46 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* 5.77 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.65 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 6.47 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้ยีสต์ขนมปัง 8 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.33 เป็นเวลา 135 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 8.16 เปอร์เซ็นต์ และ *Saccharomyces cerevisiae* 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 5.64 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตเอทานอล 9.31 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่ายีสต์ขนมปังและมีความบริสุทธิ์สูงสุด จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่า ผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยในเรื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของการใช้เอนไซม์ในการย่อยตัวอย่างที่มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์โบไฮเดรตและเซลลูโลส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด เช่น เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในงานวิจัย ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาตรเอนไซม์ 0.13 เปอร์เซ็นต์โดยมวล อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ที่ใช้อะไมโลกลูโคซิเดส ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง ได้สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียสเช่นกัน

Fan และคณะ (1987) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส โดยระบุว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้มีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดที่เหมาะสม อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เนื่องจากเอนไซม์เกิดการเสียสภาพหรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าในการทดลอง อุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสร่วมกับเอนไซม์เซลลูเลส คือ 60 องศาเซลเซียส จึงทำการเลือกอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 เวลาที่เหมาะสม

ในการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 36 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการย่อยสูงถึง 38.25 กรัมต่อลิตร แต่ในทางกลับกันที่เวลาที่ 48 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 30.62 กรัมต่อลิตร รองลงมาเวลาที่ 24 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 15.31 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายเวลาที่ 12 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 10.46 กรัมต่อลิตร โดยการหาเวลาที่เหมาะสม มีการกำหนดใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส (หัวข้อ 4.2.1) และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลังเหมือนกัน ซึ่งเวลาที่ 48 24 และ 12 ชั่วโมง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าเวลา 36 ชั่วโมง แสดงผลดังรูปที่ 4.3

Sun และคณะ (2015) ศึกษาความสำคัญของส่วนประกอบเอนไซม์ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ได้ทำการเปรียบเทียบการเตรียมเซลลูเลส Novozymes นำมาใช้ในการย่อยลิกโนเซลลูโลสจากชีวมวลธรรมชาติบนพื้นผิวที่แตกต่างกัน ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เสริมแต่ละตัวแตกต่างกัน จาการศึกษาของงานวิจัยนี้ค้นพบว่า ส่วนประกอบของเอนไซม์มีผลต่อการเตรียมเซลลูเลสที่จะส่งผลต่อการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส และถือว่าเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ระหว่างสารตั้งต้นที่หลากหลายและเซลลูเลสที่แตกต่างกันออกไป

Berson และคณะ (2014) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายของเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลา และพื้นผิวของสารตั้งต้น โดยเปรียบเทียบกับแบบจำลองการใช้การดูดซับของเซลลูเลส การทดลองใช้เครื่อง incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีค่า pHเท่ากับ 4.8 ใช้บัฟเฟอร์ citrate เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 50, 35, และ 20 องศาเซลเซียส ผลพบว่าอัตราการย่อยสลายสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเมื่อเวลาที่ 2 ชั่วโมง สูงกว่าอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และสูงกว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสถึงสองเท่า แสดงให้เห็นว่าอัตราการย่อยสลายสูงสุดจะเกิดในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรก ปัจจัยสำคัญอีกอย่างคือพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของเซลลูโลสที่ถูกวัดโดยการดูดซับของแก๊สไนโตรเจนและไอโซเทอมการคายซับ โดยใช้เครื่องดูดซับ (Micromeritics Instrument Corporation, Tristar 3000) พื้นที่ผิวที่ได้รับการปรับสภาพส่งผลต่อการย่อยสลาย การยับยั้งของเอนไซม์หรือความเฉื่อยชาของเอนไซม์จากพื้นผิวทำให้มีการศึกษาสารลดแรงตึงผิวหรือโปรตีน BSA ในการปรับสภาพก่อนการย่อยสลายเซลลูโลส

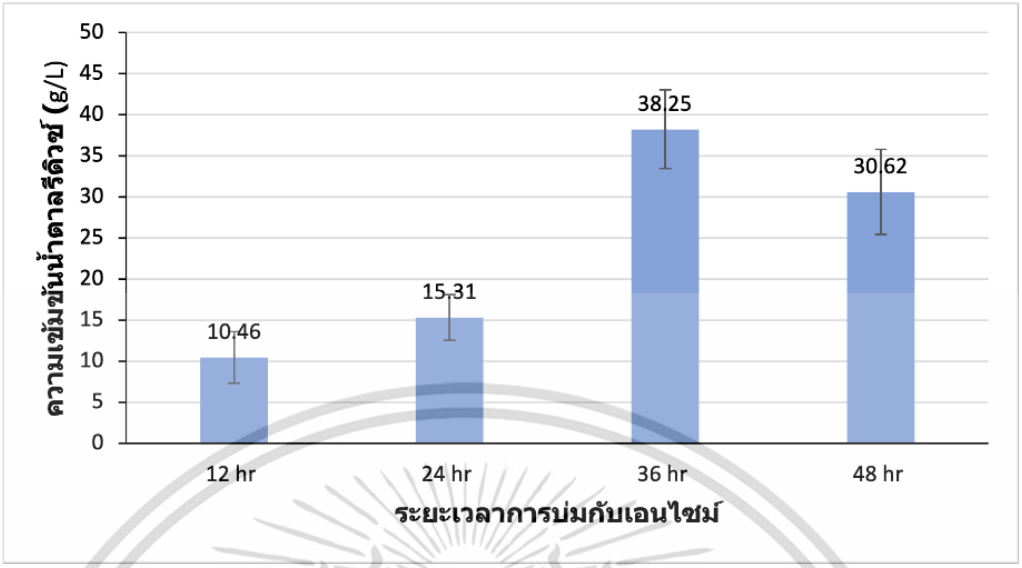
ปรียารัตน์ (2550) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยใช้กระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมัก โดยใช้แป้งเข้มข้น 0.25% ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 166.7 มิลลิยูนิต ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

333.33 มิลลิยูนิต ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 5048 หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเอทานอล 0.832 กรัม/ลิตร และ 0.8912 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาหมักที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นด้วย

หฤทัย และไพโรจน์ (2534) ศึกษาการพัฒนาการย่อยแป้งแบบขั้นตอนเดียวด้วยเอนไซม์ผสม โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในแง่อุณหภูมิ, pH และปริมาณเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส pH 5.0 ใช้เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส 1.0 กรัม/กิโลกรัม dry substance และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 7.30 กรัม/กิโลกรัม dry substance ย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นเวลา 70 ชั่วโมง ให้ค่าสมมูลเดกซ์โตรส 66.64 การย่อยแป้งมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสโดยตรง ขณะที่เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสช่วยย่อยแป้งให้มีโมเลกุลเล็กลง เพิ่มปลาย non-reducing sugar ทำให้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสทำงานได้ดีขึ้น จากงานวิจัยจะเห็นได้ว่า ผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยในเรื่องของการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง โดยบ่งบอกให้เห็นว่าการใช้ปริมาตรและส่วนประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการย่อย ในการทดลองมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลสที่ปริมาตรน้อยกว่าเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และไม่ควรใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยนานเกินไป จะทำให้ส่งผลต่อประสิทธิภาพการย่อยจะลดลง จากผลการทดลองได้สภาวะเวลาที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังเท่ากับ 36 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องและใกล้เคียงกับงานวิจัยของ ปรียารัตน์. (2550) ที่ใช้เวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสรวม 26 ชั่วโมง และจากงานวิจัยยังเผยให้เห็นว่าการย่อยแป้งมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับปริมาณเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสโดยตรง ในขณะที่เอนไซม์อัลฟาอะไมเลสช่วยย่อยแป้งให้มีโมเลกุลเล็กลงเท่านั้น จึงทำการเลือกเวลาที่ 36 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง

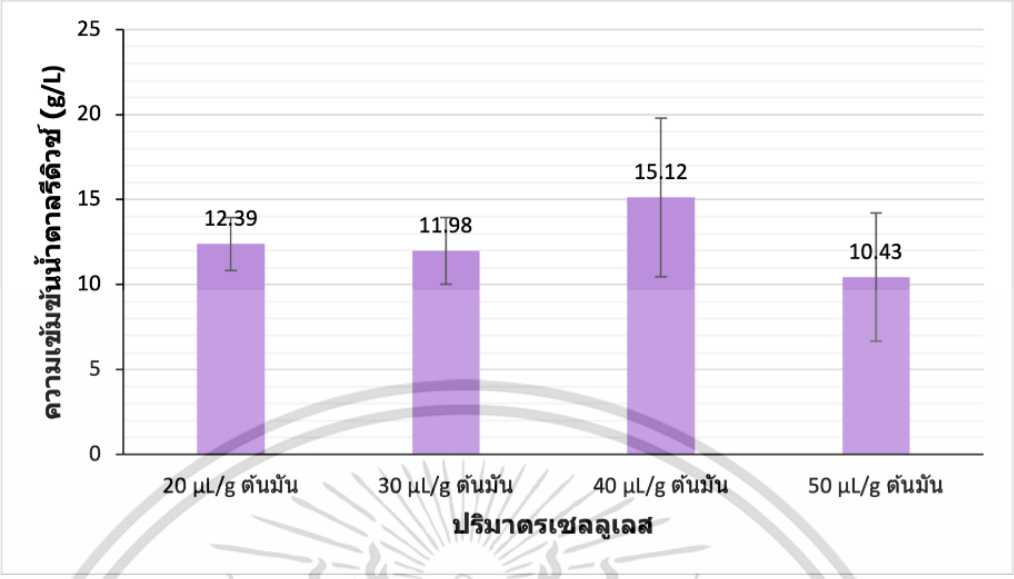
4.2.3 ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม

ในการศึกษาปริมาตรของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง พบว่าปริมาตรที่เหมาะสมคือ 40 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้หลังการย่อยสูงถึง 15.12 กรัมต่อลิตร แต่ในทางกลับกัน ปริมาตรที่ 20 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 12.39กรัมต่อลิตร ถัดมาปริมาตรที่ 30 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 11.98 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายปริมาตรที่ 50 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงเพียง 10.43 กรัมต่อลิตร โดยการหาปริมาตรที่เหมาะสม มีการกำหนดใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส (หัวข้อ 4.2.1) และเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 36 ชั่วโมง (หัวข้อ 4.2.2) เหมือนกัน ซึ่งการใช้ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่ 20 30 และ 50 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง มีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่าการใช้ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่ 40 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง แสดงดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุลีนารถ และกัลยา (2558) ศึกษาการเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยมีตัวแปรคือ อุณหภูมิ (45, 50, 55 องศาเซลเซียส), pH (4, 5, 6), และปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลส (1:20, 2:20, 3:20, 4:20 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมเซลลูโลส) ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลพบว่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH 4 เหมาะสมที่สุด และปริมาณเอนไซม์ 3:20 มิลลิกรัมเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมเซลลูโลสให้ร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุด 66% และร้อยละผลได้น้ำตาลกลูโคส 51.6% การทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลสมีผลต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์รวมสูงสุด โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นกับจำนวนการชนกันของโมเลกุลเอนไซม์และสารตั้งต้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มมากเกินไป อัตราปฏิกิริยาจะคงที่เนื่องจากสารตั้งต้นหมดและน้ำตาลกลูโคสที่สะสมจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น endoglucanase และ exoglucanase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า ผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับงานวิจัยในเรื่องของการใช้ปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง โดยในงานวิจัยค้นพบว่าปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสต่อเซลลูโลสมีผลต่อร้อยละผลได้น้ำตาลรีดิวซ์ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นกับจำนวนการชนกันของโมเลกุลเอนไซม์และสารตั้งต้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น แต่หากเพิ่มมากเกินไป อัตราปฏิกิริยาจะคงที่เนื่องจากสารตั้งต้นหมดและน้ำตาลกลูโคสที่สะสมจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด จึงได้เลือกปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่ 40 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลังไปใช้ในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังเพื่อเป็นส่วนประกอบของอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ครบ 45 กรัมต่อลิตรต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง และเติมเอนไซม์ Cellulase from *Trichoderma reesei* ปริมาตร 20 30 40 และ 50 ไมโครลิตรต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4.3 ผลการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในระดับถังหมัก

นำเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ปริมาณ 60 มิลลิลิตร มาใส่ลงในอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 600 มิลลิลิตร ใส่หัวเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 60 มิลลิลิตร แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์, ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง, ค่า pH และค่าความขุ่นของเซลล์ OD 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์

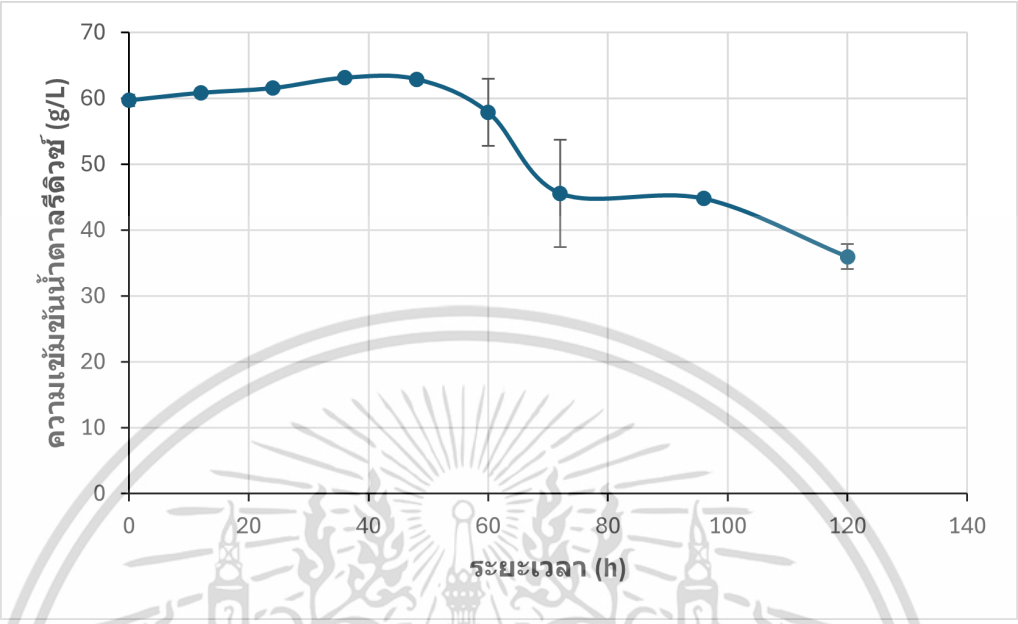
ผลการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JMC 1419 โดยใส่ลงในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

เวลา (ชั่วโมง)	T6 + กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม)	T6 + ลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด + กลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร
0	$59.685^{c} \pm 0.866$	$59.748^{b} \pm 0.000$
12	$60.823^{c} \pm 0.247$	$61.423^{c} \pm 0.000$
24	$61.535^{c} \pm 0.265$	$61.623^{c} \pm 0.778$
36	$63.110^{c} \pm 0.301$	$62.973^{c} \pm 0.000$
48	$62.898^{c} \pm 0.000$	$58.773^{b} \pm 1.202$
60	$57.856^{c} \pm 5.085$	$55.235^{a} \pm 0.442$
72	$45.583^{b} \pm 8.141$	$56.282^{a} \pm 1.471$
96	$44.786^{b} \pm 0.430$	$55.123^{a} \pm 0.283$
120	$35.949^{a} \pm 1.911$	$55.499^{a} \pm 0.618$

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงผล คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

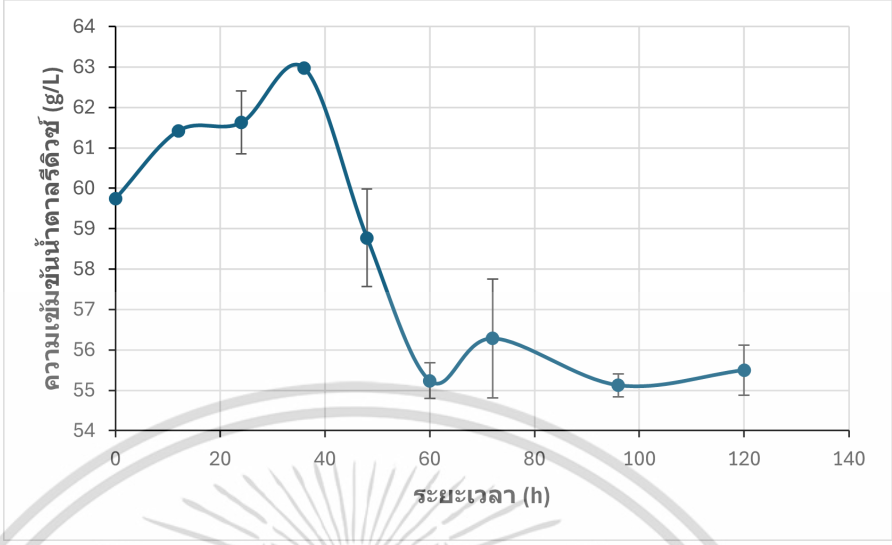


รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

จากตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.5 เห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ในช่วงเวลา 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 59.685 กรัมต่อลิตร และมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 60.823 และ 61.535 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากน้ำระเหยออกจากถังหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดพบในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 63.110 กรัมต่อลิตร จากนั้นในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 62.898 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 60 ชั่วโมง ถึง 120 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 57.856, 45.583, 44.786 และ 35.949 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มีการเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 36 ชั่วโมง และหลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงเวลา 120 ชั่วโมง

จากการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ เพิ่มขึ้นจาก 59.685 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 0 ชั่วโมง เป็น 63.110 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 35.949 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์น้ำตาลของ *Clostridium acetobutylicum* ในกระบวนการหมัก (Jones และคณะ, 2021)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์ ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.6 เห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ในช่วงเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงเท่ากับ 59.748 กรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง เป็น 61.423 และ 61.623 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดพบในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 62.973 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 58.773 กรัมต่อลิตร และลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 60 ชั่วโมง ถึง 96 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 55.235, 56.282 และ 55.123 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในช่วงเวลา 120 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 55.499 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์มีการเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 36 ชั่วโมง และหลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงเวลา 120 ชั่วโมง แต่มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงสุดท้ายของการหมัก

จากการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส, และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ เพิ่มขึ้นจาก 59.748 กรัมต่อลิตรเริ่มต้นในช่วงเวลา 0 ชั่วโมง เป็น 62.973 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึง 55.499 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาเกี่ยวกับการใช้น้ำตาลโดย *Clostridium acetobutylicum* ในกระบวนการหมัก (Smith และคณะ, 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

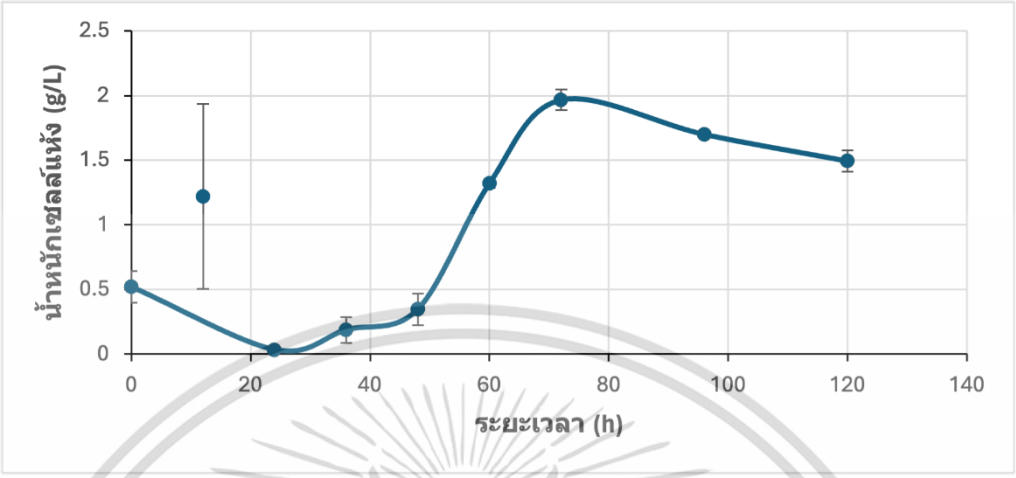
ผลการศึกษาเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 โดยใส่ลงในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างตามเวลาที่กำหนด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนที่ได้มาล้างน้ำกลั่นอีกหนึ่งรอบ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เวลา 2 วัน หลังจากอบ นำตะกอนไปชั่งเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

เวลา (ชั่วโมง)	T6 + กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม)	T6 + ลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด + กลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร
0	$0.520^{b} \pm 0.122$	$0.620^{c} \pm 0.072$
12	$1.220^{c} \pm 0.716$	$0.840^{d} \pm 0.020$
24	$0.033^{a} \pm 0.023$	$0.860^{d} \pm 0.131$
36	$0.187^{ab} \pm 0.101$	$0.720^{cd} \pm 0.100$
48	$0.347^{ab} \pm 0.122$	$0.040^{a} \pm 0.020$
60	$1.320^{cd} \pm 0.035$	$1.420^{e} \pm 0.087$
72	$1.967^{e} \pm 0.081$	$1.293^{e} \pm 0.103$
96	$1.700^{de} \pm 0.020$	$0.650^{c} \pm 0.099$
120	$1.493^{cd} \pm 0.081$	$0.313^{b} \pm 0.081$

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงผล คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

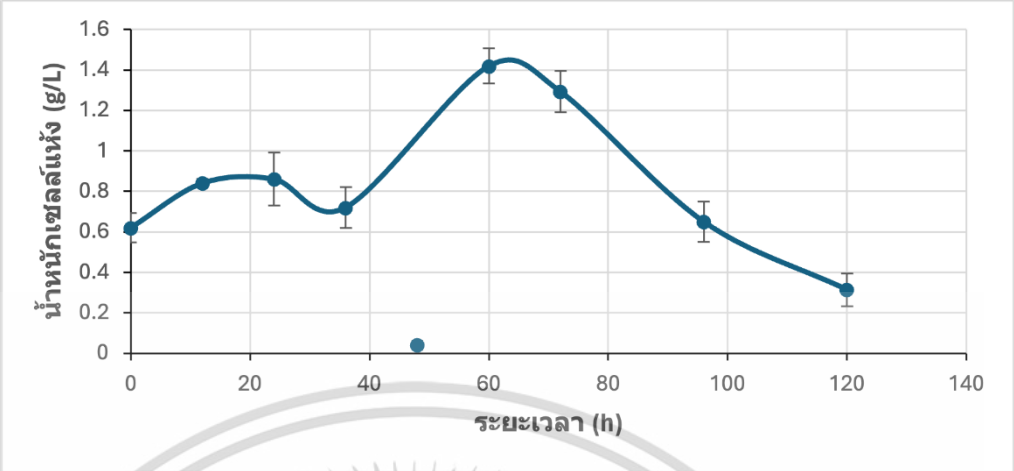
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 0.520 กรัมต่อลิตรในเวลา 0 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเป็น 1.220 กรัมต่อลิตรในเวลา 12 ชั่วโมง และลดลงเหลือ 0.033 กรัมต่อลิตรในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอีกครั้งเป็น 0.187 กรัมต่อลิตรในเวลา 36 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเป็น 0.347 กรัมต่อลิตรในเวลา 48 ชั่วโมง ในเวลา 60 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 1.320 กรัมต่อลิตรและสูงสุดที่ 1.967 กรัมต่อลิตรในเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเป็น 1.700 กรัมต่อลิตรในเวลา 96 ชั่วโมง และลดลงต่อเนื่องเป็น 1.493 กรัมต่อลิตรในเวลา 120 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 72 ชั่วโมงก่อนจะลดลงในช่วงเวลาต่อมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 0.620 กรัมต่อลิตร จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.840 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.860 กรัมต่อลิตรในเวลา 24 ชั่วโมง ในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเล็กน้อยเป็น 0.720 กรัมต่อลิตร ก่อนจะลดลงอย่างชัดเจนเป็น 0.040 กรัมต่อลิตรในเวลา 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 1.420 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 60 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเป็น 1.293 กรัมต่อลิตรในช่วงเวลา 72 ชั่วโมง ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเหลือ 0.650 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายลดลงเป็น 0.313 กรัมต่อลิตรในเวลา 120 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นมีการลดลงในช่วงเวลา 36 ถึง 48 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นสูงสุดในเวลา 60 ชั่วโมง ก่อนจะลดลงอีกครั้งในช่วงเวลาที่เหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

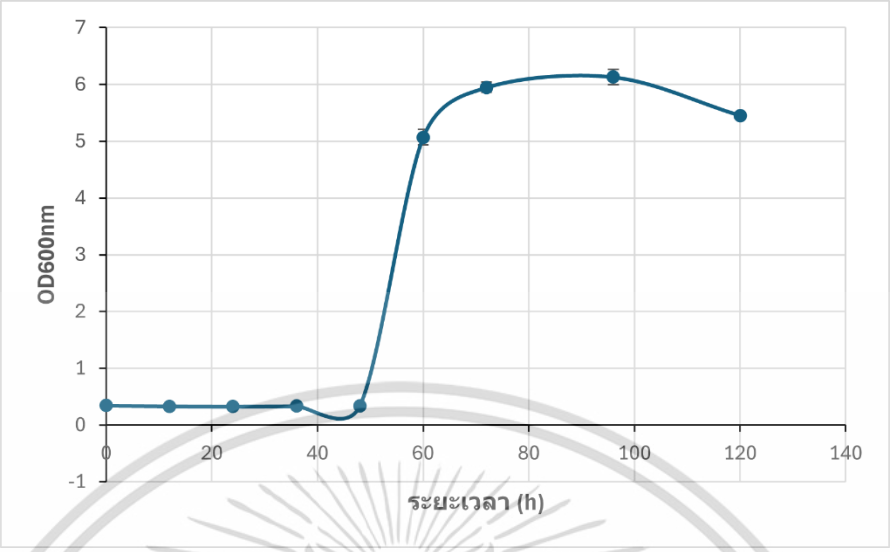
นำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร มาวัดค่าความขุ่นของอาหารจากค่า OD 600 นาโนเมตร ได้ผลตามตารางที่ 4.3 รูปที่ 4.9 และรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.3 ค่า OD 600 นาโนเมตร ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

เวลา (ชั่วโมง)	T6 + กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม)	T6 + ลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด + กลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร
0	$0.344^{a} \pm 0.006$	$0.737^{a} \pm 0.002$
12	$0.332^{a} \pm 0.003$	$0.724^{a} \pm 0.011$
24	$0.326^{a} \pm 0.002$	$0.780^{a} \pm 0.007$
36	$0.334^{a} \pm 0.004$	$0.766^{a} \pm 0.007$
48	$0.340^{a} \pm 0.002$	$0.771^{a} \pm 0.007$
60	$5.068^{b} \pm 0.136$	$4.192^{d} \pm 0.171$
72	$5.947^{d} \pm 0.089$	$3.947^{c} \pm 0.034$
96	$6.128^{e} \pm 0.136$	$3.517^{b} \pm 0.132$
120	$5.452^{c} \pm 0.050$	$3.404^{b} \pm 0.173$

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงผล คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

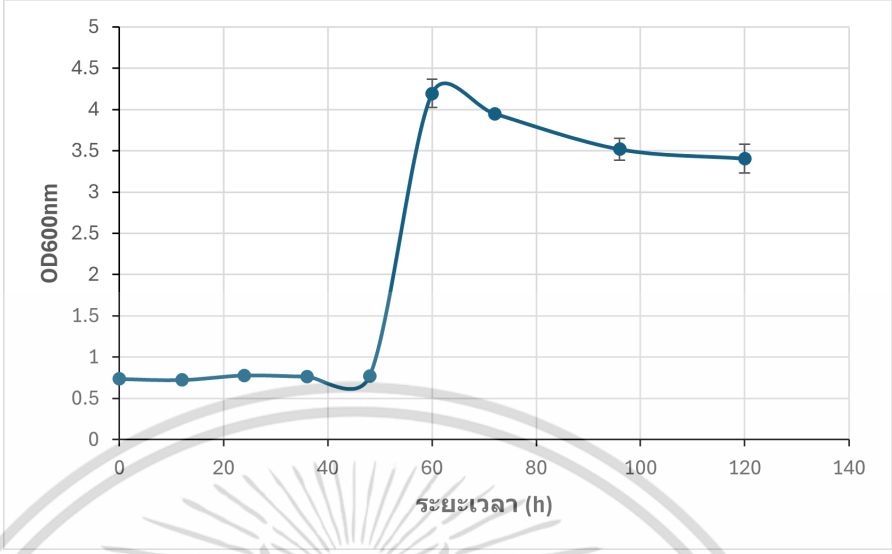
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

จากรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าค่า OD 600 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ 0.344 ในเวลา 0 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเป็น 0.332 ในเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นค่า OD 600 นาโนเมตร ลดลงเล็กน้อยอีกเป็น 0.326 ในเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.334 ในเวลา 36 ชั่วโมง ในเวลา 48 ชั่วโมง ค่า OD 600 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นเป็น 0.340 และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 5.068 ในเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นค่า OD 600 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นต่อเนื่องเป็น 5.947 ในเวลา 72 ชั่วโมง และ 6.128 ในเวลา 96 ชั่วโมง สุดท้ายค่า OD 600 นาโนเมตร ลดลงเล็กน้อยเป็น 5.452 ในเวลา 120 ชั่วโมง จากผลการทดลองว่าค่า OD 600 นาโนเมตร มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงเวลา 96 ชั่วโมง ก่อนจะลดลงเล็กน้อยในช่วงเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าค่า OD 600 นาโนเมตร เริ่มต้นที่ 0.737 ในเวลา 0 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเป็น 0.724 ในเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นค่า OD 600 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นเป็น 0.780 ในเวลา 24 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยเป็น 0.766 ในเวลา 36 ชั่วโมง ในเวลา 48 ชั่วโมง ค่า OD 600 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นเป็น 0.771 และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 4.192 ในเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นค่า OD 600 นาโนเมตร ลดลงต่อเนื่องเป็น 3.947 ในเวลา 72 ชั่วโมง และ 3.517 ในเวลา 96 ชั่วโมง สุดท้ายค่า OD 600 นาโนเมตร ลดลงเล็กน้อยเป็น 3.404 ในเวลา 120 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าค่า OD 600 นาโนเมตร มีค่าลดลงในช่วงเวลา 0 ถึง 12 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเวลา 36 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึง 60 ชั่วโมง ก่อนจะค่อยๆ ลดลงไปถึงเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ผลการศึกษา ค่า pH ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

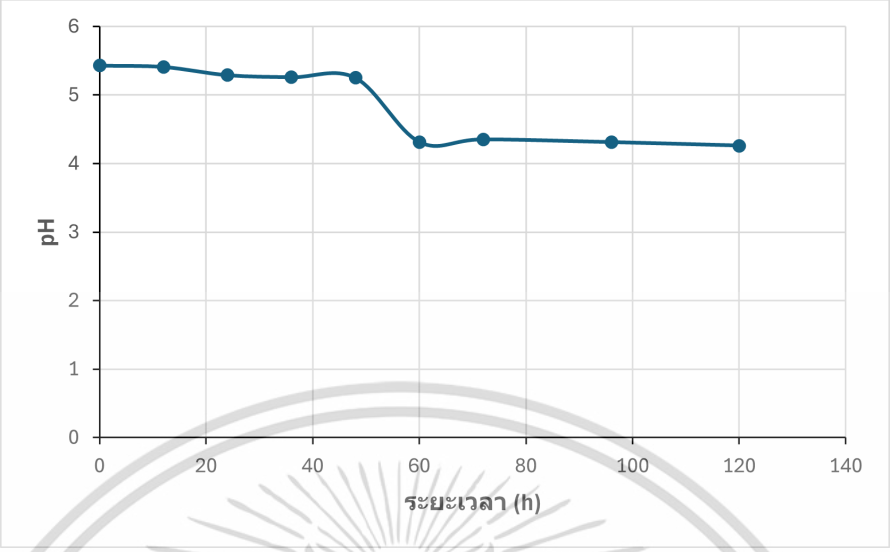
นำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร มาวัดค่า pH ได้ผลตามตารางที่ 4.4 รูปที่ 4.11 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.4 ค่า pH ที่วัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

เวลา (ชั่วโมง)	T6 + กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม)	T6 + ลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด + กลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร
0	5.430	5.530
12	5.410	5.520
24	5.290	5.440
36	5.260	5.510
48	5.250	5.510
60	4.310	4.850
72	4.350	4.860
96	4.310	4.820
120	4.260	4.830

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงผล คือ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

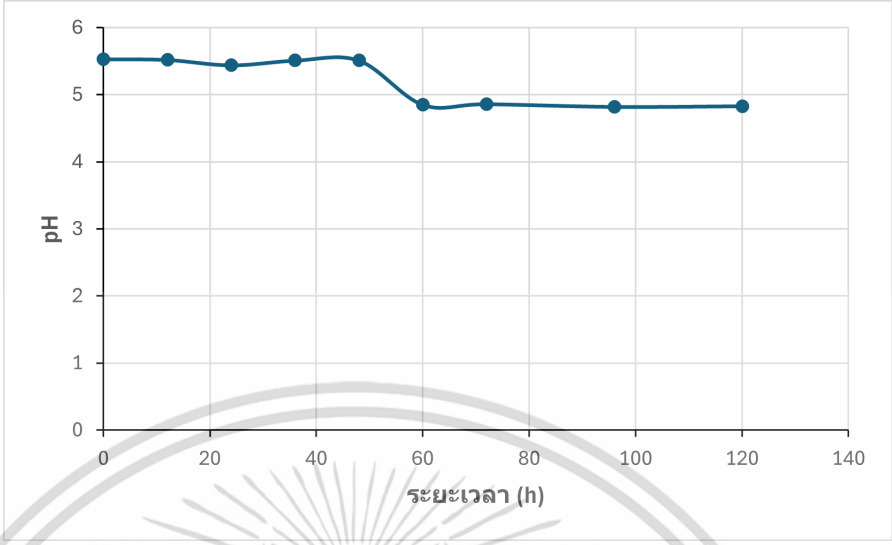


รูปที่ 4.11 ค่า pH ที่วัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

จากตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าค่า pH เริ่มต้นที่ 5.430 ในเวลา 0 ชั่วโมง ลดลงเล็กน้อยเป็น 5.410 ในเวลา 12 ชั่วโมง และต่อเนื่องลดลงเป็น 5.290 ในเวลา 24 ชั่วโมง และ 5.260 ในเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่า pH ลดลงเล็กน้อยอีกเป็น 5.250 ในเวลา 48 ชั่วโมง และลดลงอย่างมากเป็น 4.310 ในเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นค่า pH มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 4.350 ในเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงอีกครั้งเป็น 4.310 ในเวลา 96 ชั่วโมง และสุดท้ายลดลงเหลือ 4.260 ในเวลา 120 ชั่วโมง สรุปได้ว่าค่า pH มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีการลดลงอย่างมากในช่วงเวลาหลัง 48 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 พบว่าเชื้อมีการสร้างกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดบิวทิริก (butyric acid), กรดอะซีติก (acetic acid), และกรดแลกติก (lactic acid) ซึ่งสังเกตได้จากการลดลงของค่า pH อย่างต่อเนื่องจาก 5.430 ในเวลา 0 ชั่วโมง เป็น 4.260 ในเวลา 120 ชั่วโมง การลดลงของ pH แสดงถึงการสะสมของกรดอินทรีย์ในระหว่างการหมัก (Jones และ Woods, 1986; Ezeji และคณะ, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ค่า pH ที่วัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าค่า pH เริ่มต้นที่ 5.530 ในเวลา 0 ชั่วโมง ลดลงเล็กน้อยเป็น 5.520 ในเวลา 12 ชั่วโมง และต่อเนื่องลดลงเป็น 5.440 ในเวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้น 5.510 ในเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงเท่ากัน หลังจากนั้นค่า pH ลดลงอย่างมากเป็น 4.850 ในเวลา 60 ชั่วโมง และค่า pH มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 4.860 ในเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงอีกครั้งเป็น 4.820 ในเวลา 96 ชั่วโมง สุดท้ายลดลงเหลือ 4.830 ในเวลา 120 ชั่วโมง สรุปได้ว่าค่า pH มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีการลดลงอย่างมากในช่วงเวลาหลัง 48 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 พบว่ามีการสร้างกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมัก โดยสามารถสังเกตได้จากค่า pH ที่ลดลงอย่างชัดเจนในช่วงเวลา 60 ถึง 120 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ถึงการผลิตกรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดบิวทีริก (Butyric acid), กรดอะซิติก (Acetic acid) และกรดแลคติก (Lactic acid) การผลิตกรดเหล่านี้เป็นลักษณะเฉพาะของ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jones และ Woods (1986) และ Girbal และ Soucaille (1994) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิดในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 จลนพลศาสตร์เบื้องต้น

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในการใช้อาหารสองชนิด ได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส, เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและผลิตกรดอินทรีย์ได้ในทั้งสองอาหาร โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคสเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 36 ชั่วโมงก่อนลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงเวลา 120 ชั่วโมง ในขณะที่อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการหมัก น้ำหนักเซลล์แห้งในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 72 ชั่วโมงก่อนลดลง ส่วนในอาหารที่มีลำต้นมันสำปะหลัง น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมง และลดลงในเวลาต่อมา ค่า OD 600 นาโนเมตร ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 96 ชั่วโมงก่อนลดลงเล็กน้อย ส่วนในอาหารที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลัง ค่า OD 600 นาโนเมตรเพิ่มขึ้นจนถึงเวลา 60 ชั่วโมงและลดลงอย่างต่อเนื่อง ค่า pH ในทั้งสองอาหารมีแนวโน้มลดลงตลอดการหมัก บ่งชี้ถึงการสะสมของกรดอินทรีย์หลายชนิด นอกจากนี้ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 0.520 กรัมต่อลิตร ในเวลา 0 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเป็น 1.220 กรัมต่อลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งบ่งบอกถึงระยะ Lag phase และ Log phase หลังจากนั้นลดลงเหลือ 0.033 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง เป็นช่วงระยะ Stationary phase และลดลงอีกในช่วง 24 ถึง 36 ชั่วโมง ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเป็น 0.187 กรัมต่อลิตร ในเวลา 36 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเป็น 0.347 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในช่วงนี้เกิดการฟื้นตัวของเซลล์อย่างชัดเจน น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 1.967 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ Stationary phase สุดท้าย หลังจากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องเป็น 1.700 กรัมต่อลิตร ในเวลา 96 ชั่วโมง และ 1.493 กรัมต่อลิตร ในเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงระยะ Death phase ในทางตรงกันข้าม เมื่อนำ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ใส่ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นที่ 0.620 กรัมต่อลิตร ในเวลา 0 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเป็น 0.840 กรัมต่อลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.860 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง แสดงถึงระยะ Lag phase และ Log phase ในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเล็กน้อยเป็น 0.720 กรัมต่อลิตร ก่อนจะลดลงอย่างชัดเจนเป็น 0.040 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ Stationary phase จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 1.420 กรัมต่อลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการฟื้นตัวของเซลล์และสูงสุดในช่วงนี้ หลังจากนั้นลดลงเล็กน้อยเป็น 1.293 กรัมต่อลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และลดลงต่อเนื่องเป็น 0.650 กรัมต่อลิตร ในเวลา 96 ชั่วโมง และสุดท้ายลดลงเป็น 0.313 กรัมต่อลิตร ในเวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงระยะ Death phase จากการทดลองน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตามระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของเชื้อโดยสรุปได้ว่าระยะ Lag phase และ Log phase จะมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่ระยะ Stationary phase และ Death phase จะมีการลดลงของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ

เมื่อนำค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 มาคำนวณค่าจลนพลศาสตร์เปรียบเทียบระหว่างอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร ผลได้พบว่าอาหารที่ใช้ T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.084 h^{-1} ค่าผลผลิตชีวมวลต่อซับสเตรท ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.103 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอยู่ที่ 1.967 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.013 h^{-1} ค่าผลได้ชีวมวลต่อซับสเตรท ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.177 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดอยู่ที่ 1.420 กรัมต่อลิตร ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอาหารที่ประกอบด้วยลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์ต่าง ๆ ส่งผลให้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่ผลได้ชีวมวลต่อซับสเตรทกลับสูงกว่าเล็กน้อย ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางเลือกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่างๆ จากกระบวนการหมัก งานวิจัยโดย Han และคณะ (2011) พบว่าการใช้มันสำปะหลังและอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักด้วย *Clostridium acetobutylicum* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญ (Han และคณะ, 2011)

นอกจากนี้ งานวิจัยโดย Jiang และคณะ (2013) ยังแสดงให้เห็นว่าการปรับเปลี่ยนสภาวะการหมัก เช่น ความเข้มข้นของเหล็กในสารละลาย สามารถเพิ่มการผลิตบิวทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานเหล่านี้สนับสนุนการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและการปรับปรุงเงื่อนไขการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตในกระบวนการหมักแบบ batch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเจริญเติบโตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 ในอาหาร 2 ชนิด นำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยมีอัตราเร็วใบพัด 300 rpm, อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และสภาวะไร้ออกซิเจน

ค่าจลนพลศาสตร์	T6 + กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม)	T6 + ลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลสที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด + กลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร
μ (h^{-1})	0.084	0.013
$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)	0.103	0.177
น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ($g.L^{-1}$)	1.967	1.420

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์และเปรียบเทียบอาหาร 2 ชนิด ได้แก่ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และ อาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร ซึ่งลำต้นมันสำปะหลังที่นำมาทำการศึกษา เป็นวัสดุเหลือใช้จากทางการเกษตร ในการผลิตไบโอบิวทานอลด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* โดยเริ่มจากการนำลำต้นมันสำปะหลังมาปรับสภาพด้วยการละลายลิกนิน และปรับสภาพด้วย Soxhlet extraction ที่ใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสม 50 และ 60 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสม 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังคือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมินี้ เมื่อนำลำต้นมันสำปะหลังมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาตร 30 ไมโครลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 16.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 12.95 กรัมต่อลิตร

ในการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการย่อยลำต้นมันสำปะหลัง พบว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 36 ชั่วโมง โดยที่เวลานี้ให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 38.25 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เวลาที่ยาวขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง กลับให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 30.62 กรัมต่อลิตร ส่วนเวลาที่สั้นลงคือ 24 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมงให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 15.31 กรัมต่อลิตรและ 10.46 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาตรของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยลำต้นมันสำปะหลังคือ 40 ไมโครลิตร โดยให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 15.12 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาตรอื่นๆ เช่น 20 ไมโครลิตร, 30 ไมโครลิตร, และ 50 ไมโครลิตรให้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าคือ 12.39 กรัมต่อลิตร, 11.98 กรัมต่อลิตร, และ 10.43 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้ จึงได้สรุปว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยลำต้นมันสำปะหลังคือการใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 36 ชั่วโมง และปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่ 40 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในการเตรียมลำต้นมันสำปะหลังให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

จากการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 พบว่าอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) สูงกว่าเท่ากับ 0.084 h^{-1} เมื่อเทียบกับอาหารที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีค่า (μ) เท่ากับ 0.013 h^{-1} อย่างไรก็ตาม อาหารที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังให้ค่าผลผลิตชีวมวลต่อซับสเตรท ($Y_{x/s}$) สูงกว่าเท่ากับ 0.177 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ขณะที่อาหารกลูโคสมีค่า ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.103 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางเลือกนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวภาพต่าง ๆ จากการหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควบคุมอุณหภูมิใน Soxhlet Extraction : เพื่อป้องกันการสูญเสียและระเหยของอะซิโตน ควรควบคุมอุณหภูมิอย่างเหมาะสม เพิ่มประสิทธิภาพการสกัดและลดการสูญเสียตัวทำละลาย
2. ตรวจสอบการเพาะเลี้ยงและการหมัก : ควรตรวจสอบเชื้ออย่างสม่ำเสมอเพื่อป้องกันการปนเปื้อน รักษาคุณภาพและความบริสุทธิ์ของเชื้อ ลดปัญหาการปนเปื้อน และเพิ่มความแม่นยำในการควบคุมกระบวนการผลิต
3. ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ยังมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสารอาหารเพิ่มเติมได้ ซึ่งอาจช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่างๆ เช่น กากน้ำตาล (Molasses), เปลือกผลไม้, ข้าวสาลี, และข้าวบาร์เลย์ที่เหลือจากการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือการกลั่นสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้

การวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรราคาถูก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรมชีวภาพและพัฒนาในอนาคต.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิราพรรณ นามวงษ์, ฉัตรชัย อรรถบัญชา และชวัลรัตน์ เชื่อวงษ์. 2561. "การย่อยกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกเพื่อการเพาะเลี้ยงและการผลิตบิวทานอลของ Clostridium sp." ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และวรวุธ จุนาลักษณานุกูล. 2555. "ไบโอบิวทานอล: เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล." *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. 22(1) : 704

ชุลีนารถ ฝั้นเครือ และกัลยา ประมาณเมือง. 2558. การเตรียมน้ำตาลกลูโคสจากเซลลูโลสด้วยเอนไซม์. ปริญญานิพนธ์, สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ปรียารัตน์ โยวะผุย. 2550. การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการทำให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมักจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ผกามาส ปุรินทราภิบาล. (2552). "เคมีเอนไซม์ทางอาหาร." [online]. Available : http://agro-industry.rmutsv.ac.th/upload/papers/87d56dd343a67365.ppt

วรลักษณ์ คงจินดามุนี .2556. การผลิตเอทานอลจากแกนข้าว, วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. (2546). "ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส." [online]. Available : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1174/amylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตศาสตร์. 2558. มันสำปะหลัง. [online]. Available : https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=73917

สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. "การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. "วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาควิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุข. ศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. 22(5): 642 – 649

สุนทร กาญจรบุรี. 2555. "การศึกษาการผลิตแอซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมัก "วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สูไฮลา สาและ. 2559. "การผลิตบโอบิวทานอลจากสาหร่าย Rhizoclonium sp. ด้วยเชื้อ *Clostidium bejjerinki* TISTR 1461 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเคมีประยุกต์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หฤทัย จิตต์ภักดี และไพโรจน์ กิจจนะพานิช. 2534. การย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ผสมอัลฟาอะมิเลสและอะมิโลกลูโคซิเดส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. "พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง". วารสารสิ่งแวดล้อม. 16(2) : 36-42.

อังคณา สุจริต, ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, วรกันต์ บุรพาธนะ และเหมือน เดือนพิศาลพงศ์. 2553. "การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ". วิศวกรรมสาร มข. 2553(4) : 339-347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Balat, M., 2011, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, Energy Convers.Manage. 52: 858-875.

Blanchard, J. S., & Stoll, V. S. (1990). Use of buffers in the control of pH and ionic strength. *Methods in Enzymology*, 182, 455-468.

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J.,Ramachandran, K.B. and Ramakrishnan,S., 2011, Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review, Enzyme Res. p1: 1-17.

Colon Institute. (2012). "Amylase". [online]. Available :http://coloninstitute.org/supplements/amylase/

Cheng, J., 2009, Biomass to Renewable Energy Processes, Taylor and Francis Group, New York.

Desai, R. P., & Papoutsakis, E. T. (1999). Antisense RNA strategies for metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum. Applied and Environmental Microbiology, 65(2), 936-945.

Ezeji, T. C., Qureshi, N., & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on Clostridium beijerinckii growth and butanol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 97(6), 1460-1469.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Fubao Fuebiol Sun., Hong J., Hu J., Jack N Saddler, Zhang Z., Shen S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. Enzyme and Microbial Technology. 79-80; (2015): 42-48

Fan, L. T., Gharpuray, M. M., Lee, Y-H. Cellulose hydrolysis. Springer-Verlag berlin Heidelberg. London. (1987)

Girbal, L., & Soucaille, P. (1994). Regulation of solvent production in Clostridium acetobutylicum. FEMS Microbiology Reviews, 15(2-3), 193-204.

Grupe, H., & Gottschalk, G. (1992). Physiological events in Clostridium acetobutylicum during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3896-3902.

Harun, M.Y., Radiah, A.B.D., Abidin, Z.Z.,Yunus, R., 2011, Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhornia crassipes),Biores. Technol. 102: 5193-5199.

Han, B., Ujor, V., Lai, L. B., & Ezeji, T. C. (2011). “Use of cassava and sugarcane in acetone–butanol–ethanol fermentation with Clostridium acetobutylicum.” Applied Microbiology and Biotechnology, 91(2), 202-217.

Jiang, W., Zhang, Y., Liu, H., & Ma, J. (2013). “Enhanced butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation with Clostridium acetobutylicum by varying iron ion concentration.” Bioresource Technology, 139, 189-194.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological Reviews, 50(4), 484-524.

Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological reviews, 50(4), 484-524.

Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiology Review*. 50: 484-524.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J.and Stroeve, P., 2009, Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel

Lee, S. Y., & Park, J. H. (2005). Advances in the biotechnological production of butanol. Applied Microbiology and Biotechnology, 74(5), 621-629.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. Biotechnology and Bioengineering, 101(2), 209-228.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry,* 31(3), 426-428.

Monot, F., Martin, J. R., Petitdemange, H., & Gay, R. (1982). Acetone and butanol production by Clostridium acetobutylicum in a synthetic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6), 1318-1324.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Ogata, S., Hongo, M., Tabata, K., & Uemura, I. (1973). Studies on the utilization of Tryptone Yeast extract Acetate for the growth of Clostridium acetobutylicum. *Journal of Fermentation Technology*, 51(1), 12-19.

Patakova, P., Linhova, M., Rychtera, M., Paulova, L. and Melzoch, K. (2013). Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia: *Clostridium* metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. Biotechnology Advances. 31: 58-67.

Papoutsakis, E. T. (2008). Engineering solventogenic clostridia. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), 420-429.

Pejo, E.T., Olive, J.M. and Ballesteros, M.,2008, Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review, J. Sci. Ind. Res. 67: 874-884.

Sun, Y. and Cheng,J., 2002, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, Biores. Technol. 83: 1-11.

Wang, X., Li, J., Zhang, Y., & Chen, H. (2020). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for lignocellulosic biomass to enhance bioethanol production. *Bioresource Technology*, 310, 123456.

Welch, T. P., Kiyanda, C., & Liao, J. C. (2017). Metabolic Engineering for Alcohol Production in *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, 40, 124-130.

Ye Z., R Eric Berson. Factors affecting cellulose hydrolysis based on inactivation of adsorbed enzymes. Bioresource Technology. 167; (2014): 582-586

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสารละลายและกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Blanchard และ Stoll, 1990)

สารละลาย ก สารละลายของกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ทำการละลายกรดอะซิติก 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) สารละลาย ข สารละลายของโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ทำการละลาย $C_2H_3O_2Na_3$ 16.4 กรัม หรือ $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ 27.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เตรียมอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยใช้ 14.8 มิลลิลิตรของสารละลาย ก ผสมกับ 35.2 มิลลิลิตรของ สารละลาย ข และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้อะซิเตตบัฟเฟอร์มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5

การเตรียมสารละลายเพื่อทดลองหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (ดัดแปลงจากวิธีของ Miller และคณะ, 1959)

การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันดี โดยใช้ที่กวนละลายลาย (Magnetic Stirer) จะได้ความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ จากนั้นเติม 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 ถึง 90 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารโพแทสเซียมทาเททลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

อบกลูโคสด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น 1 คืน นำกลูโคสมาชั่ง 0.1 กรัม ละลายโดยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ทำการเจือจางกลูโคสจากความเข้มเข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็น 0.1 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 กรัมต่อลิตร

คำนวณได้จากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1g/l) \times V_1 = (0.1\ g/l) \times (5\ ml)$$

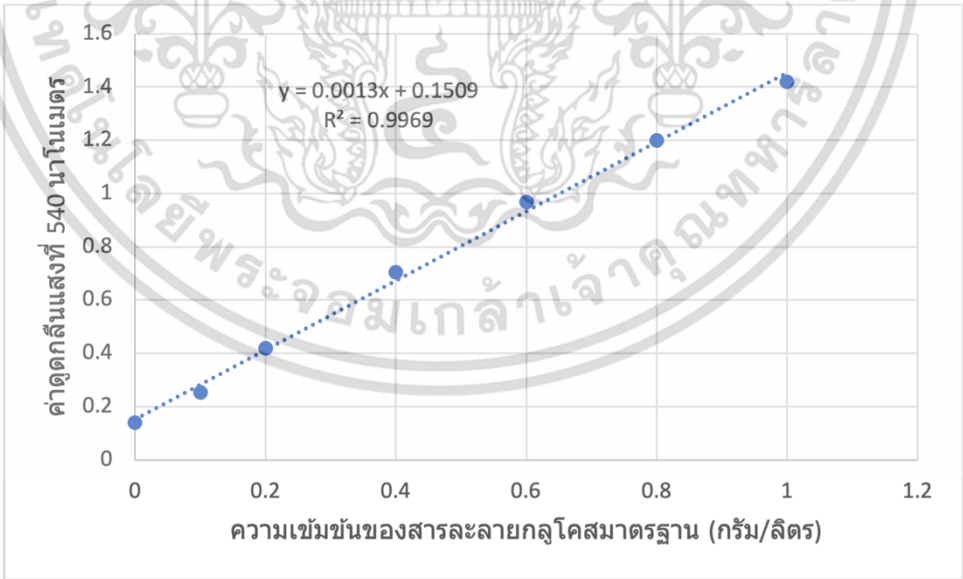
$$V_1 = 0.5\ ml$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารลละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 5 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก.1 ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มขนต่างๆ ที่ทำการวิเคราะห์ด้วย Dinitrosalicylic acid (DNS)

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กรัม/ลิตร)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0	0.14
0.1	0.25
0.2	0.42
0.4	0.70
0.6	0.97
0.8	1.20
1.0	1.42



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายเอนไซม์สำหรับย่อย

เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

α-Amylase from *Bacillus licheniformis* ของ บริษัท Sigma มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 827 ยูนิตต่อกรัมลำต้นมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 22.2 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร

ถ้า 1 มิลลิกรัม มีเอนไซม์ 827 ยูนิต

ดังนั้น 22.2 มิลลิกรัม มีเอนไซม์เท่ากับ $\frac{827\ x\ 22.2}{1}$ = 18359.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ทำการเตรียมสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปิเปตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5 ปริมาตร 99.95 มิลลิลิตร

ดังนั้นที่สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 100 มิลลิลิตร จะมีเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เท่ากับ 0.05 x 18359.4 = 917.97 ยูนิต

เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* ของ บริษัท Sigma มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ทำการเตรียมสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นร้อยละ 0.015 โดยปิเปตเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5 ปริมาตร 99.98 มิลลิลิตร

ดังนั้นที่สารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 100 มิลลิลิตร จะมีเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส เท่ากับ 0.015 x 300 = 4.5 ยูนิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และหลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12.200	8	1.525	24.187	.000
Within Groups	1.135	18	.063		
Total	13.335	26			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05				
Time	N	1	2	3	4	5
24	3	.0333				
36	3	.1867	.1867			
48	3	.3467	.3467			
0	3		.5200			
12	3			1.2200		
60	3			1.3200	1.3200	
120	3			1.4933	1.4933	
96	3				1.7000	1.7000
72	3					1.9667
Sig.		.164	.140	.223	.095	.210

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.5200	.12166	.07024	.2178	.8222	.38
12	3	1.2200	.71582	.41328	-.5582	2.9982	.42
24	3	.0333	.02309	.01333	-.0240	.0907	.02
36	3	.1867	.10066	.05812	-.0634	.4367	.08
48	3	.3467	.12220	.07055	.0431	.6502	.24
60	3	1.3200	.03464	.02000	1.2339	1.4061	1.30
72	3	1.9667	.08083	.04667	1.7659	2.1675	1.88
96	3	1.7000	.02000	.01155	1.6503	1.7497	1.68
120	3	1.4933	.08083	.04667	1.2925	1.6941	1.40
Total	27	.9763	.71617	.13783	.6930	1.2596	.02

Descriptives

	Maximum
0	.60
12	1.80
24	.06
36	.28
48	.48
60	1.36
72	2.04
96	1.72
120	1.54
Total	2.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.461	8	.558	79.951	.000
Within Groups	.126	18	.007		
Total	4.586	26			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05				
Time	N	1	2	3	4	5
48	3	.0400				
120	3		.3133			
0	3			.6200		
96	3			.6500		
36	3			.7200	.7200	
12	3				.8400	
24	3				.8600	
72	3					1.2933
60	3					1.4200
Sig.		1.000	1.000	.181	.066	.080

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.6200	.07211	.04163	.4409	.7991	.54
12	3	.8400	.02000	.01155	.7903	.8897	.82
24	3	.8600	.13115	.07572	.5342	1.1858	.74
36	3	.7200	.10000	.05774	.4716	.9684	.62
48	3	.0400	.02000	.01155	-.0097	.0897	.02
60	3	1.4200	.08718	.05033	1.2034	1.6366	1.36
72	3	1.2933	.10263	.05925	1.0384	1.5483	1.18
96	3	.6500	.09900	.04041	.4761	.8239	.58
120	3	.3133	.08083	.04667	.1125	.5141	.22
Total	27	.7507	.41999	.08083	.5846	.9169	.02

Descriptives

	Maximum
0	.68
12	.86
24	1.00
36	.82
48	.06
60	1.52
72	1.38
96	.72
120	.36
Total	1.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และหลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	190.317	8	23.790	4501.203	.000
Within Groups	.095	18	.005		
Total	190.412	26			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05				
Time	N	1	2	3	4	5
24	3	.3259				
12	3	.3317				
36	3	.3337				
48	3	.3398				
0	3	.3435				
60	3		5.0677			
120	3			5.4520		
72	3				5.9467	
96	3					6.1280
Sig.		.793	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.3435	.00641	.00370	.3276	.3594	.34
12	3	.3317	.00331	.00191	.3235	.3400	.33
24	3	.3259	.00185	.00107	.3213	.3305	.32
36	3	.3337	.00366	.00211	.3246	.3428	.33
48	3	.3398	.00201	.00116	.3348	.3448	.34
60	3	5.0677	.13645	.07878	4.7287	5.4066	4.91
72	3	5.9467	.08864	.05117	5.7265	6.1669	5.85
96	3	6.1280	.13599	.07851	5.7902	6.4658	6.05
120	3	5.4520	.05027	.02902	5.3271	5.5769	5.40
Total	27	2.6966	2.70620	.52081	1.6260	3.7671	.32

Descriptives

	Maximum
0	.35
12	.33
24	.33
36	.34
48	.34
60	5.17
72	6.02
96	6.29
120	5.50
Total	6.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	61.609	8	7.701	890.319	.000
Within Groups	.156	18	.009		
Total	61.764	26			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05			
Time	N	1	2	3	4
12	3	.7239			
0	3	.7369			
36	3	.7663			
48	3	.7710			
24	3	.7799			
120	3		3.4037		
96	3		3.5167		
72	3			3.9473	
60	3				4.1923
Sig.		.516	.154	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	3	.7369	.00246	.00142	.7308	.7430	.74
12	3	.7239	.01113	.00642	.6963	.7516	.71
24	3	.7799	.00715	.00413	.7621	.7976	.77
36	3	.7663	.00723	.00417	.7483	.7842	.76
48	3	.7710	.00690	.00398	.7538	.7881	.77
60	3	4.1923	.17069	.09855	3.7683	4.6163	4.07
72	3	3.9473	.03350	.01934	3.8641	4.0306	3.93
96	3	3.5167	.13193	.07617	3.1889	3.8444	3.38
120	3	3.4037	.17293	.09984	2.9741	3.8333	3.25
Total	27	2.0931	1.54128	.29662	1.4834	2.7028	.71

Descriptives

	Maximum
0	.74
12	.73
24	.79
36	.77
48	.78
60	4.39
72	3.99
96	3.64
120	3.59
Total	4.39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร (ควบคุม) และหลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2557.834	8	319.729	14.415	.000
Within Groups	421.418	19	22.180		
Total	2979.252	27			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a,b]

		Subset for alpha = 0.05		
Time	N	1	2	3
120	4	35.9488		
96	4		44.7862	
72	6		45.5825	
60	4			57.8562
0	2			59.6850
12	2			60.8225
24	2			61.5350
48	2			62.8975
36	2			63.1100
Sig.		1.000	.848	.269

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	2	59.6850	.86621	.61250	51.9024	67.4676	59.07
12	2	60.8225	.24749	.17500	58.5989	63.0461	60.65
24	2	61.5350	.26517	.18750	59.1526	63.9174	61.35
36	2	63.1100	.30052	.21250	60.4099	65.8101	62.90
48	2	62.8975	.00000	.00000	62.8975	62.8975	62.90
60	4	57.8562	5.08470	2.54235	49.7654	65.9471	52.98
72	6	45.5825	8.14090	3.32351	37.0392	54.1258	34.73
96	4	44.7862	.42956	.21478	44.1027	45.4698	44.42
120	4	35.9488	1.91127	.95563	32.9075	38.9900	33.74
Total	28	51.5700	10.50441	1.98515	47.4968	55.6432	33.74

Descriptives

	Maximum
0	60.30
12	61.00
24	61.72
36	63.32
48	62.90
60	62.61
72	53.36
96	45.36
120	37.77
Total	63.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร T6 ที่มีส่วนประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และเติมกลูโคสให้น้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่า 45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นนำไปหมักแบบ batch fermentation ในลงถังหมัก ขนาด 1 ลิตร

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	171.829	8	21.479	33.059	.000
Within Groups	7.796	12	.650		
Total	179.625	20			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a,b]

		Subset for alpha = 0.05		
Time	N	1	2	3
96	2	55.1225		
60	2	55.2350		
120	4	55.4988		
72	3	56.2817		
48	2		58.7725	
0	2		59.7475	
12	2			61.4225
24	2			61.6225
36	2			62.9725
Sig.		.187	.228	.078

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
0	2	59.7475	.00000	.00000	59.7475	59.7475	59.75
12	2	61.4225	.00000	.00000	61.4225	61.4225	61.42
24	2	61.6225	.77782	.55000	54.6341	68.6109	61.07
36	2	62.9725	.00000	.00000	62.9725	62.9725	62.97
48	2	58.7725	1.20208	.85000	47.9722	69.5728	57.92
60	2	55.2350	.44194	.31250	51.2643	59.2057	54.92
72	3	56.2817	1.47078	.84915	52.6281	59.9353	55.32
96	2	55.1225	.28284	.20000	52.5813	57.6637	54.92
120	4	55.4988	.61773	.30886	54.5158	56.4817	55.12
Total	21	58.1252	2.99687	.65397	56.7611	59.4894	54.92

Descriptives

	Maximum
0	59.75
12	61.42
24	62.17
36	62.97
48	59.62
60	55.55
72	57.98
96	55.32
120	56.42
Total	62.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยการทดสอบ T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Fifty	12.9530	12	3.28857	.94933
	Sixty	15.9303	12	1.93598	.55887

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Fifty & Sixty	12	-.629	.028

Paired Samples Test

		Paired Differences				
					95% Confidence Interval of the Difference	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Lower	Upper
Pair 1	Fifty - Sixty	-2.97727	4.75123	1.37156	-5.99606	.04152

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Fifty - Sixty	-2.171	11	.053

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาเวลาที่เหมาะสม

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1515.684	3	505.228	29.857	.000
Within Groups	135.372	8	16.922		
Total	1651.057	11			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
Time	N	1	2
12	3	10.4600	
24	3	15.3142	
48	3		30.6183
32	3		38.2517
Sig.		.186	.053

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
12	3	10.4600	3.12072	1.80175	2.7077	18.2123	8.37
24	3	15.3142	2.78518	1.60803	8.3954	22.2329	12.16
32	3	38.2517	4.80814	2.77598	26.3076	50.1957	33.67
48	3	30.6183	5.20307	3.00399	17.6932	43.5435	26.37
Total	12	23.6610	12.25137	3.53667	15.8769	31.4452	8.37

Descriptives

	Maximum
12	14.05
24	17.44
32	43.26
48	36.42
Total	43.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.9 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอมไซม์แอลฟาอะไมเลส เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส และเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อหาปริมาตรเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสม

ตาราง ANOVA

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.264	3	11.421	1.084	.410
Within Groups	84.310	8	10.539		
Total	118.574	11			

ตารางความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล โดยทดสอบ Duncan's

yield

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05
Volume	N	1
50	3	10.4308
30	3	11.9767
20	3	12.3892
40	3	15.1183
Sig.		.135

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
20	3	12.3892	1.55625	.89850	8.5232	16.2551	10.84
30	3	11.9767	1.97414	1.13977	7.0726	16.8807	9.72
40	3	15.1183	4.65743	2.68897	3.5486	26.6880	11.70
50	3	10.4308	3.76087	2.17134	1.0883	19.7733	6.94
Total	12	12.4787	3.28321	.94778	10.3927	14.5648	6.94

Descriptives

	Maximum
20	13.95
30	13.40
40	20.42
50	14.41
Total	20.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 17 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2567

ข้าพเจ้า นางสาว ศิริกัญญา แก้วขุนทศ รหัสประจำตัว 63050523

นางสาว สริดา อ่อนน้ำคำ รหัสประจำตัว 63050524

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษเรื่อง

ชื่อภาษาไทย สภาวะที่หมาะสมต่อการย่อยลำต้นมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสเพื่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419

ชื่อภาษาอังกฤษ Optimal Conditions of Cassava Stem Hydrolysis by Amylase and Cellulase for *Clostridium acetobutylicum* JCM 1419 Growth

ปีการศึกษา 2566

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับบสมบูรณ์

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 2.63 %

ลงชื่อ.....ศิริกัญญา แก้วขุนทศ..... ลงชื่อ.....สริดา อ่อนน้ำคำ.....

(นางสาวศิริกัญญา แก้วขุนทศ) (นางสาวสริดา อ่อนน้ำคำ)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า ผศ.ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้น แล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาจารย์ที่ปรึกษา