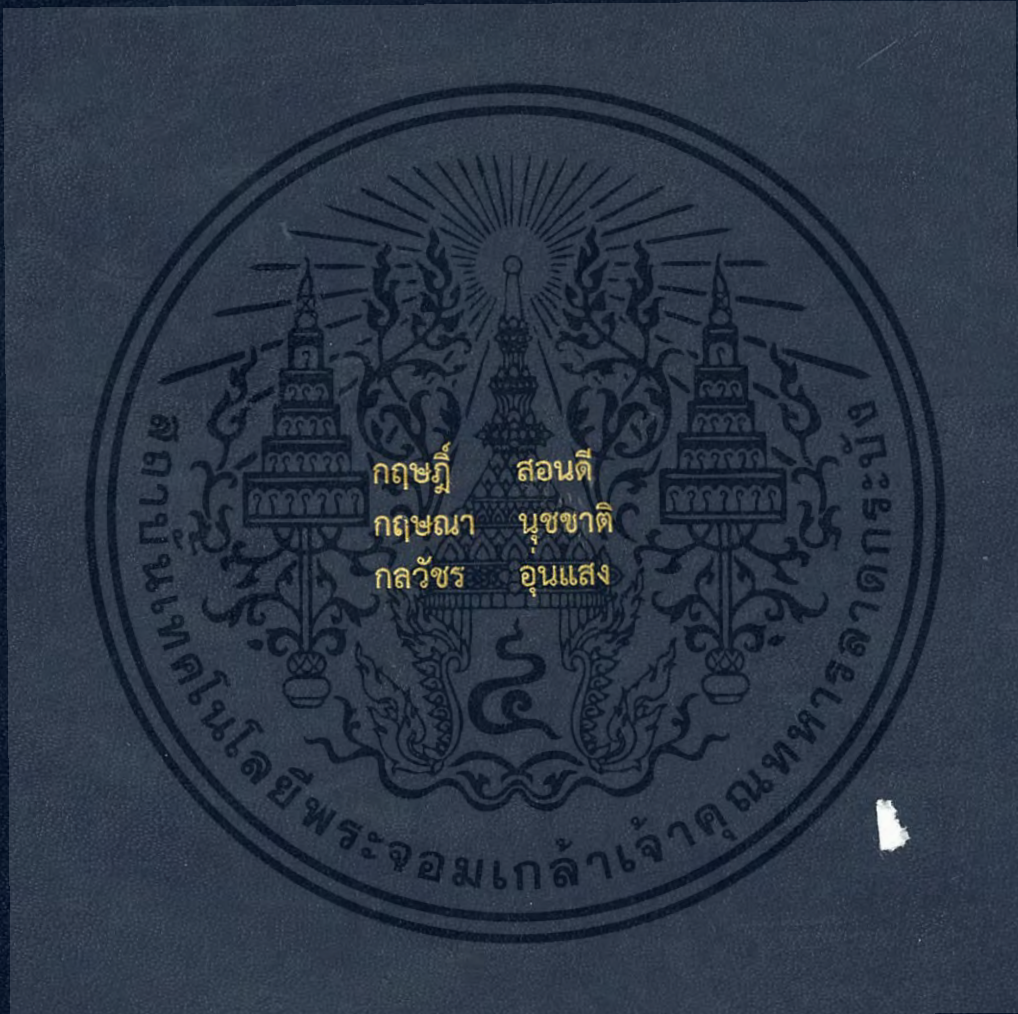


การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เตรียม
มาจากซังข้าวโพดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

STUDY OF *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 MEDIA PREPARED
FROM CORN COBS IN BIOREACTOR



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เตรียม
มาจากซังข้าวโพดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

STUDY OF *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 MEDIA PREPARED
FROM CORN COBS IN BIOREACTOR



ร.ท.
ก 279 ก
2558

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 149218
วันเดือนปี..... 29 ส.ค. 2561

b. 12881673
f.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY OF *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 MEDIA PREPARED
FROM CORN COBS IN BIOREACTOR



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*
 DSM 792 ที่เตรียมมาจากซังข้าวโพดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
 Study of *Clostridium acetobutylicum* media prepared
 from corn cobs in bioreactor

ชื่อนักศึกษา

นายกฤษฎี สอนดี 55051056
 นางสาวกฤษณา นุชชาติ 55051057
 นายกลวัชร อุ่นแสง 55051058

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา



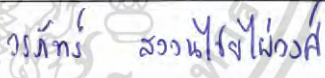
ปีการศึกษา

2558

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา แลกต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เตรียมมาจากซังข้าวโพดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Study of *Clostridium acetobutylicum* media prepared from corn cobs in bioreactor

ชื่อนักศึกษา

นายกฤษฎ์ สอนดี 55051056

นางสาวกฤษณา นุชชาติ 55051057

นายกลวัชร อุ่นแสง 55051058

ปริญญา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2558

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีการศึกษาผลของวิตามิน และเกลือแร่ และน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพซังข้าวโพด และย่อยด้วยเอนไซม์ ต่อการสร้างสารผลิตภัณฑ์อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากการหมัก (ABE fermentation) ด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ GYCC โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นชุดควบคุมอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยสารละลายวิตามินและเกลือแร่ อาหาร GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดที่ได้จากการย่อย และปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยสารละลายวิตามินและเกลือแร่ และใช้ซังข้าวโพดที่ได้จากการย่อย และปรับสภาพเป็นแหล่งคาร์บอน โดยซังข้าวโพดที่ผ่านการบดจะถูกนำมาผ่านการปรับสภาพด้วย 1 M NaOH ในหม้อนิ่งแรงดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของซังไปย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 โดยไม่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยง *C. acetobutylicum* พบว่าวิตามินและเกลือแร่ มีส่วนช่วยให้เชื้อผลิตบิวทานอลได้เร็วขึ้นโดยอาหารที่เสริมด้วยวิตามินและเกลือแร่ทำให้ความเข้มข้นบิวทานอลสูงสุด (0.06 กรัมต่อลิตร) ที่ 12 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารที่ไม่เติมสารละลายวิตามินและเกลือแร่พบปริมาณบิวทานอลสูงสุด (0.05 กรัมต่อลิตร) ที่ ชั่วโมงที่ 96 แต่มีความเข้มข้นไม่ต่างกัน ในขณะที่สารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดมีส่วนช่วยให้เชื้อผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดเท่ากับ 0.07 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72

คำสำคัญ : การย่อยด้วยเอนไซม์ การหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ซังข้าวโพด อาหาร GYCC *Clostridium acetobutylicum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Study of <i>Clostridium acetobutylicum</i> media prepared from corn cobs in bioreactor		
Student	Mr. Krit	Sondee	Student ID 55051056
	Ms. Kritsana	Nutchat	Student ID 55051057
	Mr. Konlawat	Unsaeng	Student ID 55051058
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Academic Year	2015		
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong , Ph.D.		

Abstract

The effects of vitamins, mineral solutions and corn cob hydrolysate on acetone, butanol and ethanol (ABE) production of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 were studied. Glucose-Yeast extract-Casein-Cystein (GYCC) supplemented with vitamins and mineral solutions, GYCC contained reducing sugars from enzymatic hydrolyzed corn cobs and GYCC contained reducing sugars from enzymatic hydrolyzed corn cob supplemented with vitamins and mineral solutions have been utilized for microbial growth media, to compared with GYCC contained glucose 50 g/L. Corn cob has been pretreated by 1 M NaOH in autoclave at 121°C, 15 psi for 30 minutes, then hydrolyzed by ACCELLURASE1500 without using buffer. ABE fermentation by *C. acetobutylicum* has been carried out. The result showed that vitamins and mineral salt solutions supported culture to produce biobutanol more rapidly. The highest concentration of biobutanol (0.06 g/L) in GYCC supplemented with vitamins and mineral salt solutions has been found at 12 hours. While the highest concentration of biobutanol (0.05 g/L) in control medium has been found at 96 hours with no significantly difference. On the other hand, reducing sugars from enzymatic hydrolyzed corn cob supported culture to produce highest concentration of biobutanol (0.07 g/L) at 72 hours.

Keywords : enzymatic hydrolysis, Acetone-Butanol-Ethanol fermentation, corn cob, GYCC medium, *Clostridium acetobutylicum*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณพี่เจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาทั้งอาคารจุฬารัตน์วลัยลักษณ์ 1 และอาคารวิทยาศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ และปัญหาในการทำโครงการพิเศษ และขอบคุณพี่เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาคชีววิทยาที่ช่วยเป็นธุระในการติดต่อขอห้องนอกเวลา ราชการ ตลอดระยะเวลาในการปฏิบัติงาน

ขอบคุณเพื่อนในกลุ่มโครงการพิเศษ กลุ่มโครงการพิเศษอาจารย์วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ทุกๆ กลุ่ม และพี่.โท ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และคำปรึกษาต่างๆ ตลอดจนคอยให้กำลังใจจนทำให้โครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล และ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ อีกทั้งยังช่วยตรวจสอบ และคำแนะนำในการทำโครงการพิเศษ อีกทั้งการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบความถูกต้อง ตลอดระยะเวลาในการทำโครงการพิเศษ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี จนโครงการพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทางคณะผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณบิดา มารดา บุพการีผู้ให้กำเนิด ที่ทำให้คณะผู้จัดทำมีวันนี้ และคอยสนับสนุนการทำโครงการพิเศษมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้โครงการพิเศษนี้จะสำเร็จไม่ได้หากขาดบุคคลข้างต้น ทางคณะผู้จัดทำจึงขอมอบคุณค่าและประโยชน์จากโครงการเล่มนี้แต่ทุกท่านที่กล่าวมา หากมีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำจึงขออภัยไว้ ณ ที่นี้

นายกฤษฎี สอนดี

นางสาวกฤษณา นุชชาติ

นายกลวัชร อุ่นแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
ภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
คำย่อและสัญลักษณ์	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 บิวทานอล	3
2.1.1 ประโยชน์ของบิวทานอล	5
2.2 กระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	6
2.2.1 ประวัติและที่มา	6
2.2.2 จุลินทรีย์	7
2.2.3 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)	7
2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก	8
2.2.4.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น	10
2.2.4.2 อุณหภูมิ	10
2.2.4.3 ออกซิเจน	10
2.2.4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้าย	11
2.3 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	11
2.4 ข้าวโพด (Indian Corn หรือ Maize)	13
2.4.1 ประวัติของข้าวโพด	13
2.4.2 ลักษณะทั่วไป และลักษณะทางพฤกษศาสตร์	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	17
2.4.4 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส	19
2.4.4.1 เซลลูโลส (Cellulose)	19
2.4.4.2 ลิกนิน (Lignin)	20
2.4.4.3 เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)	20
2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการย่อย (Pretreatment)	21
2.5.1 วิธีการเตรียมทางกายภาพ (Physical pretreatment)	22
2.5.2 วิธีการเตรียมทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical pretreatment)	23
2.5.3 วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)	24
2.5.4 วิธีการเตรียมทางชีวภาพ (Biodegradation pretreatment)	24
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	27
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์	27
3.1.2 สารเคมี	27
3.1.3 อุปกรณ์	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	28
3.2.1 อาหาร Reinforced Clostridial (RCM)	28
3.2.2 อาหาร glucose-yeast extract-casein-cysteine (GYCC)	29
3.2.3 สารละลายวิตามิน	29
3.2.4 สารละลายแร่ธาตุ	29
3.3 การเตรียมซังข้าวโพด	30
3.4 การปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยสารละลายเบส	30
3.5 กระบวนการหมัก	31
3.6 การวิเคราะห์ค่าทางจุลินทรีย์และค่าความเข้มข้นสารเคมี	31
3.6.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	31
3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)	32
3.6.3 การวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	32
3.6.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ผลของเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ในอาหาร GYCC หลัก	33
4.1.1 อาหาร GYCC หลัก	33
4.1.2 อาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเกลือแร่	37
4.1.3 อาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส	40
4.1.4 อาหาร GYCC ซังที่เสริมด้วยข้าวโพด วิตามิน และเกลือแร่	44
4.2 ผลซังข้าวโพด วิตามิน และเกลือแร่ ในอาหาร GYCC ต่อเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i>	49
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลวิจัย	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	58
ภาคผนวก ข	68



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติบางประการของบิวทานอล	4
2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล ก๊าซโซลีน และเอทานอล	5
2.3 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพด	18
2.4 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ	19
4.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	33
4.2 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	34
4.3 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่ มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	36
4.4 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อGYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่	37
4.5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส	40
4.6 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อGYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส	41
4.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่	44
4.8 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่	45
4.9 ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ที่แตกต่างกัน	49
4.10 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ด้วยอาหาร GYCC แบบต่างๆ	51
ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method)	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ก.2	59
ก.3	60
ก.4	62
ก.5	64
ก.6	65
ข.1	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน	70
ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพด แทนกลูโคส วิตามินและเกลือแร่ข	76
ข.5 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเพาะเลี้ยง <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ด้วยอาหาร GYCC แบบต่างๆ	80



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
2.1	โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	3
2.2	วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>C. acetobutylicum</i> ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ปฏิกริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (solventogenic phase)	9
2.3	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	11
2.4	ลักษณะส่วนต่างๆ ของข้าวโพด (<i>Zea mays</i>)	15
2.5	ส่วนต่างๆ ของลำต้นข้าวโพดหวานที่ประกอบด้วยใบ ช่อดอกเพศเมีย ช่อดอกเพศผู้ และฝักที่มีผลและเมล็ดติดอยู่ โดยมีเปลือกหุ้มฝักไว้หลายชั้น	16
2.6	ซังข้าวโพด	17
2.7	สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส	19
2.8	สูตรโครงสร้างของ (a) trans-coniferylalcohol (b) trans-p-sinapyl alcohol และ (c) tran-p- coumaryl alcohol	20
2.9	วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ	22
4.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. acetobutylicum</i> DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C	32
4.2	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	33
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามินเลี้ยงเชื้อ <i>C. acetobutylicum</i> DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37 °C	36
4.4	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่	37
4.5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยซังข้าวโพด เลี้ยงเชื้อ <i>C. acetobutylicum</i> DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C	39
4.6	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส	40

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยซังข้าวโพด วิตามิน และเกลือแร่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>C. acetobutylicum</i> DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C	43
4.8 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่	44
4.9 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ในแต่ละช่วงเวลา	47
4.10 ค่าความเป็นกรดต่างในแต่ละช่วงเวลา	47
4.11 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละช่วงเวลา	48
4.12 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละช่วงเวลา	49
4.13 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ที่สูงที่สุดในอาหาร GYCC แต่ละชนิด	50
ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS	58
ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดอะซิติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	59
ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลคติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	61
ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	63
ก.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	64
ก.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	66
ข.1 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่สูงที่สุดในอาหาร GYCC แต่ละชนิด	79

คำย่อและสัญลักษณ์

GYCC	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน
HPLC	เครื่องมาโครกราฟี่ของเหลวสมรรถนะสูง
ABE	อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล
pH	ค่าความเป็นกรดต่าง
SEM	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
°C	องศาเซลเซียส
g/mL	กรัมต่อมิลลิลิตร
g/L/hr	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
g/g	กรัมต่อกรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
g/kg	กรัมต่อกิโลกรัม
M	โมลาร์
%	เปอร์เซ็นต์
mg/g	มิลลิกรัมต่อกรัม
hr	ชั่วโมง
mL	มิลลิลิตร
g	กรัม
µm	ไมโครเมตร
rpm	รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บิวทานอลคือแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอมเป็นสารที่ไม่มีสีไวไฟและละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่จะละลายเข้ากับตัวทำละลายอื่นๆ ได้ดีนอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง สำหรับเครื่องยนต์และยังเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylate ester ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตสารเคลือบผิวและพลาสติก (Lee และ คณะ, 2008; Durre, 2008)

การผลิตบิวทานอลแบ่งเป็นการผลิตทางเคมีและชีวภาพทางด้านเคมีมีการผลิตบิวทานอลด้วยการสังเคราะห์ทางเคมีซึ่งต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่มาจากอนุพันธ์ของสารปิโตรเลียมซึ่งนับวันจะยิ่งหายากและลดน้อยลงนอกจากนี้ยังก่อให้เกิดสารพิษและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจึงนิยมหันมาใช้การผลิตทางชีวภาพแทน (สุขใจ, 2554) และยังพบว่าเครื่องยนต์ที่ใช้บิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ไฮโดรคาร์บอนและการปล่อยสารพิษไนโตรเจนออกไซด์ลดลงซึ่งแก๊ซเหล่านี้ถือเป็นแก๊ซที่ทำลายสิ่งแวดล้อม (ชนิกา และคณะ, 2555)

บิวทานอลสามารถผลิตได้โดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์เรียกกระบวนการหมักอะซิโตนบิวทานอลเอทานอล (Acetone, Butanol, Ethanol Fermentation, ABE Fermentation) โดยส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium sp.* โดยเฉพาะ *C. acetobutylicum* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด (สุขใจ, 2554)

การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้หรือกากทางการเกษตรรวมทั้งของเสียและผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยกระบวนการทางชีวภาพเช่นเอทานอลกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ปัจจุบันเป็นวิทยาศาสตร์ที่ได้รับการศึกษากันอย่างกว้างขวาง การผลิตโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพในระยะแรกใช้วัตถุดิบเป็นน้ำตาลที่ได้จากพืชซึ่งมีน้ำตาลสูง เช่น อ้อย หัวบีท แต่ปัจจุบันน้ำตาลที่ได้จากพืชมีราคาสูงมากดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักมาเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งและน้ำตาลที่ได้จากทรัพยากรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทน เช่น ชังข้าวโพด ที่ได้จากอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นสารตั้งต้นในการผลิต (สุขใจ, 2554) และแป้งที่ได้จากมันฝรั่งถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร P2 ที่มีการเติมวิตามิน และแร่ธาตุ (Kheyrandish และคณะ, 2014) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้จะทำการทดลองเปลี่ยนซับสเตรทจากแป้งมันฝรั่ง เป็นชังข้าวโพดที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

ข้าวโพดในอาหารสัตว์จะถูกใช้ในรูปของเมล็ดซึ่งทำให้เกิดผลพลอยได้เป็นชังข้าวโพด เป็นวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมและการเกษตร ในการศึกษาครั้งนี้จึงนำเอาชังข้าวโพดมาใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* (ไกรภพ, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการนี้ศึกษาผลของวิตามิน และแร่ธาตุต่อการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* และศึกษาการนำซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* ในระดับถังหมัก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาผลของวิตามินและแร่ธาตุในการเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum*
- 1.2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *C. acetobutylicum* โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ และย่อยเป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสในระดับถังหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหาร GYCC และอาหาร GYCC ที่มีการเสริมวิตามิน เกลือแร่ อาหาร GYCC กับซังข้าวโพด และอาหาร GYCC กับซังข้าวโพดที่เสริมวิตามิน เกลือแร่และซังข้าวโพด ที่ศึกษานำมาผ่านการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว และวิเคราะห์ค่าปริมาณสารผลิตภัณฑ์และจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *C. acetobutylicum*
- 1.4.2 นำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอย่างซังข้าวโพดมาทำให้เกิดประโยชน์
- 1.4.3 ทราบผลของวิตามิน และแร่ธาตุต่อการเจริญและการสร้างบิวทานอลของเชื้อ *C. acetobutylicum*

ไม่ต้องผ่านการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติใดๆ ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางอย่างเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติบางประการของบิวทานอล

สูตรเคมี	C ₄ H ₉ OH
น้ำหนักโมเลกุล	74.12 กรัมต่อโมล
จุดเดือด	117.7 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	-89.5 องศาเซลเซียส
ความดันไอ	7.3 มิลลิเมตรปรอท ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความถ่วงจำเพาะ	0.810 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่น (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	0.809-0.812 ที่ 20 องศาเซลเซียส
ความหนาแน่นไอ	2.6
ความสามารถในการละลาย	7.9 ที่ 20 องศาเซลเซียส
อัตราการระเหย	0.5
ความหนืด	2.96 มิลลิปาสคาลวินาที
สามารถติดไฟได้เอง	343 องศาเซลเซียส

ที่มา : International Labour Organisation, the World Health Organization และคณะ, 1987 และ <http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/1307> (07/12/2558)

นอกจากนี้ บิวทานอลยังให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานแล้ว บิวทานอลจะมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธิ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน และยังพบอีกว่าการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนประกอบให้อิเสัยที่ปราศจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนโตรออกไซด์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ด้วยคุณสมบัติที่หลากหลายของบิวทานอล (ชนิกา และคณะ, 2555; สุวิมล และอิสริยา, 2556) จึงทำให้เกิดการเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆ ระหว่าง บิวทานอล ก๊าซโซลีน และเอทานอล ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล ก๊าซโซลีน และเอทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล	ก๊าซโซลีน	เอทานอล
ความหนาแน่นพลังงาน (Energy Density, MJ/L)	29.2	32	19.6
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันและอากาศ (Air-fuel Ratio)	11.2	14.6	9
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (Heat of Vaporization, MJ/kg)	0.43	0.36	0.92
ปริมาณพลังงาน (Energy Content/Value, BTU/gal)	110,000	115,000	84,000
ความสามารถในการกระจายน้ำ 100 กรัม (Solubility)	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย	ละลาย
ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย (Research Octane Number, RON)	96	91-99	129
ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ (Motor Octane Number, MON)	78	81-89	102

ที่มา : ชนิกา และคณะ (2555) และชัชวาล และคณะ (2555)

2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล

ในด้านอุตสาหกรรม อนุพันธ์ของบิวทานอลส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Butyl acrylate ซึ่งเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี และ Methacrylate esters ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) สารยึดเกาะ (Adhesives) วัสดุสิ่งทอ (Textile) วัสดุเส้นใย (Fiber) และพลาสติก อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ Butyl glycol ether, Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น อนุพันธ์ของบิวทานอลเหล่านี้ยังใช้เป็นตัวทำละลายที่ดีในอุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมรถยนต์ อุตสาหกรรมขึ้นรูป รวมทั้งเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกลิ่นรส อุตสาหกรรม การผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมการผลิตยา ปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมน (Lee และคณะ, 2008; Durre, 2008)

ในแง่ของพลังงาน บิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตทางชีวภาพสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันเอทานอลจะยังเป็นที่นิยมกว่าก็ตาม แต่ด้วยสมบัติหลายประการของบิวทานอล ทำให้บิวทานอลมีข้อได้เปรียบมากกว่าเอทานอล (ชนิกา และคณะ, 2555) บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนโดยตรง หรือนำไปเป็นส่วนผสมในน้ำมัน ทั้งน้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน (Jay, 2010) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซินมากกว่าเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากัน เครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่า มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนน้ำมันเบนซิน พบว่าเครื่องยนต์เดินได้ตามปกติ โดยที่มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าน้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบนซินร้อยละ 9 ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลในปริมาณที่สูงกว่าน้ำมันเบนซิน แต่พบว่าการใช้บิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนได้ออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และการปล่อยสารพิษไนโตรเจนออกไซด์ลดลง ซึ่งแก๊สเหล่านี้ถือเป็นแก๊สที่ทำลายสิ่งแวดล้อม (ชนิกา และคณะ, 2555)

2.2 กระบวนการหมัก อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล (Acetone Butanol Ethanol, ABE Fermentation)

2.2.1 ประวัติและที่มา

การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบอะซีโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์พาสเตอร์ในปี ค.ศ. 1905 คือการบวนการผลิตตัวทำลายอินทรีย์ได้แก่ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติโดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบีตาไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตวัสดุระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังสงครามยุติความต้องการอะซีโตนจึงลดน้อยลงแต่กลับมีความต้องการอะซีโตนมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตรถยนต์และอุตสาหกรรมสีต่อมาในปี ค.ศ. 1950-1960 อุตสาหกรรมการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลทางชีวภาพเริ่มหยุดชะงักทั้งในอเมริกาเหนือ และยุโรปเนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีในประเทศจีน (ชนิกา และคณะ, 2555)

ความสำคัญของกระบวนการผลิตตัวทำลายอินทรีย์ดังกล่าวเริ่มลดลงภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่กลับมาเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นในปี ค.ศ. 1979 เป็นต้นมา เนื่องจากราคาน้ำมันดิบของโลกเริ่มมีราคาสูงขึ้น และเริ่มลดน้อยลง แต่ถึงอย่างไรก็ตามกระบวนการหมักดังกล่าวก็ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ค่อนข้างสูงอยู่เมื่อเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม (Jones และ Woods, 1986)

2.2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

แบคทีเรียกลุ่ม Clostridia เป็น แบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้และเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนและมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ ทั้งนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (Exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆได้เช่น *Clostridium tetanus*, *Clostridium botulinum* เป็นต้น อย่างไรก็ตามในช่วยศตวรรษที่ 20 แบคทีเรียกลุ่ม clostridia ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์โดยเฉพาะสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* และ *C. brijerinckii* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตหลายชนิดให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น อะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล ด้วยกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลโดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอลและอะซิโตนแต่ถ้าสภาวะที่ไม่เหมาะสมแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะผลิตอะซิโตนและเอทานอล เป็นผลผลิตหลัก ต่อมาแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ถูกนำไปพัฒนาเพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล) ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตตัวทำละลายบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอลจากแป้ง น้ำตาล ที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (Pentose) ได้ในอัตราส่วน 6:3:1 ตามลำดับ (Qureshi, 2001 และ Lee และคณะ, 2008)

2.2.3 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of the fermentation)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะได้แก่ ระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (solventogenic) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้อง กับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลายอินทรีย์รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.2 ทั้งนี้ น้ำตาลในกลุ่มเฮกโซส (hexose, C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกด้วยน้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุลพร้อมกับการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุลและ NADH+H⁺ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาลเพนโทส (pentose C5) จะถูกเมทาบอลิซ์ด้วยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate) เกิดการสร้างสาร Fructose - Meyerhof glycolytic phosphate ตามลำดับก่อนจะเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ต่อไป

กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลโคเอ คาร์บอนไดออกไซด์ และรีดิวซ์เฟอริดอกซิน (reduce ferredoxin) โดยเอนไซม์ไพรูเวตเฟอริดอกซินไฮโดรดีอกเตส ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็นโคเอนไซม์เอทั้งนี้อะซิติลโคเอที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นของการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดยอะซิติลโคเอ (acetyl coA) 2 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็น อะซิโตนอะซิติล-โคเอ ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทริกโดยจะทำให้ค่าพีเอชของน้ำหมักลดลง

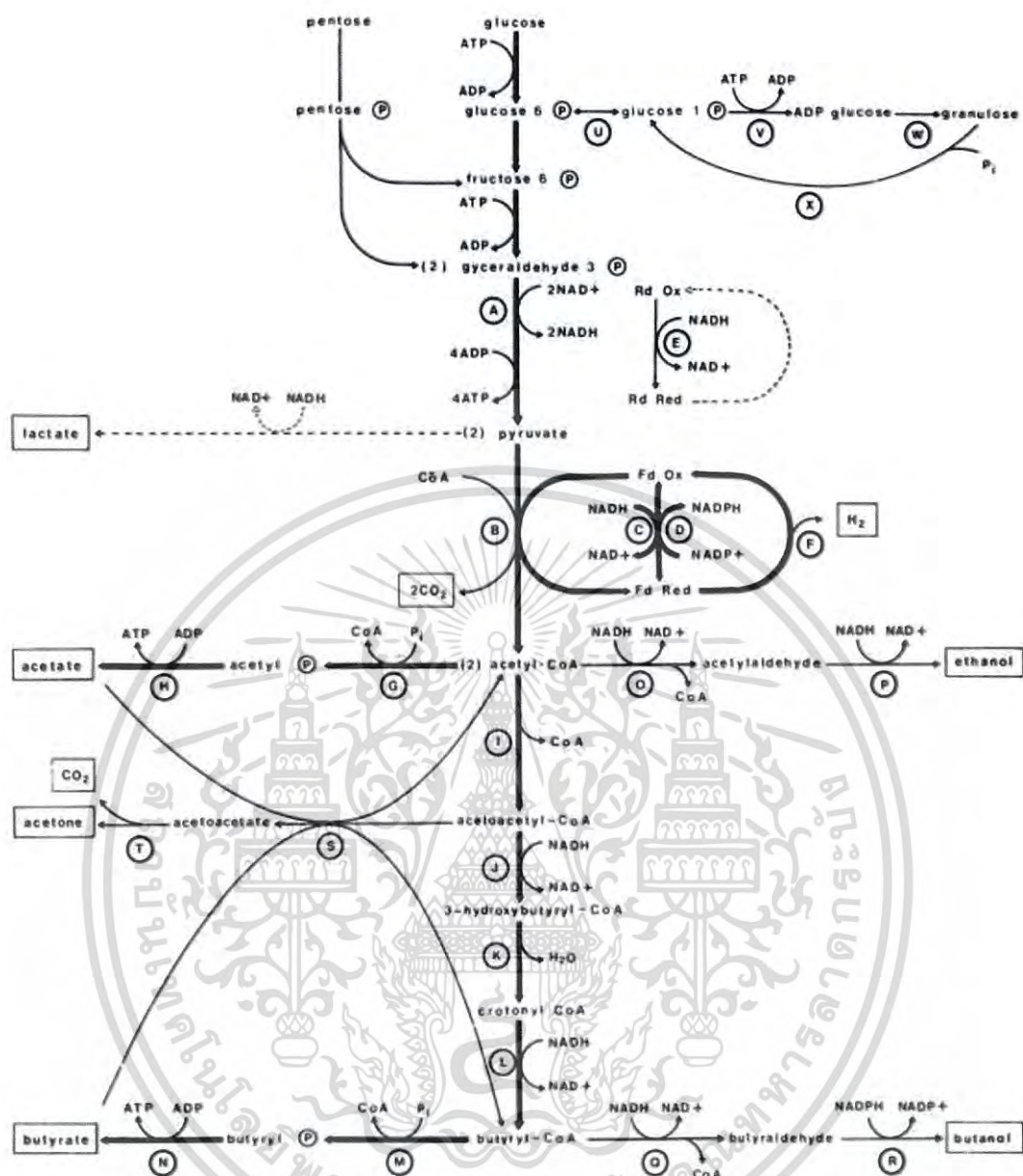
ไม่่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงนี้นอกจากนี้อะซิโต-อะซิติล-โคเอ ยังถูกใช้เพื่อสร้างอะซิเตทด้วย ซึ่งต่อมาอะซิเตทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกริยาดังกล่าวเป็นปฏิกริยาที่กลับไม่ได้

ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดยูริกในปริมาณที่เป็นพิษและช่วยกำจัด 2 ปฏิกริยาที่สร้าง NAD⁺ แบบที่เรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน บิวทิเรท กลับไปเป็นบิวทิริล-โคเอแล้ว บิวทิริล-โคเอ จะถูกกลรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมากสำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจากอะซิโตอะซิติล-โคเอ เช่นกัน โดยผ่าน 2 ปฏิกริยาเริ่มจากอะซิโตอะซิติล-โคเอถูกเปลี่ยนเป็น อะซิทัลดีไฮด์โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่อะซิทัลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ NADH+H⁺ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD⁺ ด้วย (Jones Woods, 1986)

2.2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพ จากการผลิตกรดอินทรีย์ไปเป็นการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์มีความยุ่งยากซับซ้อน ได้มีการทำการศึกษาค้นคว้ามากมายเพื่อที่จะเข้าใจถึงสาเหตุของปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักทั้งในกระบวนการหมักแบบกะ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) โดยมุ่งหวังที่จะค้นหาสาเหตุ ของปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ และรักษาภาวะดังกล่าวไว้ให้นานที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนระยะดังกล่าวก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดถึงแม้ว่าการศึกษาค้นคว้าดังกล่าวจะนำมาซึ่งข้อมูลใหม่ๆ แต่ก็เป็นที่เข้าใจว่าไม่มีปัจจัยเฉพาะปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่สามารถกระตุ้นการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Robinson, 1992)



รูปที่ 2.2 วิธีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (solventogenic phase)

หมายเหตุ เอนไซม์ต่างๆแสดงตามตัวอักษร : (glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase; (D) NADPH-pyruvate-ferredixinoxidoreductase; (E) NADH rubredoxinoxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (J) thiolase (acetyl-CoA-acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutylase) ; (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehydedehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่งานวิจัยฉบับก่อนพิมพ์ซึ่งยังไม่ผ่านการตรวจสอบและแก้ไขข้อผิดพลาดใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(S) acetoacetyl-CoA:CoAtransferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase

2.2.4.1 แหล่งของสารตั้งต้นและความเข้มข้น

ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็นสิ่งสำคัญในการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตร การหมักจะมุ่งไปสู่กระบวนการสร้างกรด โดยจะผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้เพียงเล็กน้อยอย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นสูง(สูงกว่า 60 กรัมต่อลิตร) ได้มากกว่า และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 80 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นสูงถึง 120 กรัมต่อลิตร กิจกรรมการหมักจะเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อยซึ่งอาจเป็นเพราะการยับยั้งของวัตถุดิบ

กลไกการส่งผ่านน้ำตาลยังไม่เป็นที่เข้าใจชัดเจน อย่างไรก็ตามเชื่อกันว่าระบบฟอสโฟทรานเฟอร์เรส (phosphotransferase) ทำให้เกิดการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสและการใช้วัตถุดิบอย่างอื่นของ *C. acetobutylicum* ที่เกิดขึ้นโดยซิมพอร์ท แมคคาไนซึม (Symport mechanism) จะเกิดขึ้นโดยการส่งผ่านโปรตอนผ่านเยื่อเลือกผ่าน สำหรับน้ำตาลโมเลกุลคู่เช่นน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลมอลโตสจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ฟอสโฟไรเลส (phosphorylase) และกลูโคสอิสระที่ได้สามารถเปลี่ยนไปเป็นGlucose-6- phosphate โดยเอนไซม์ เฮกโซไคเนส

2.2.4.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการหมักมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์อย่างยิ่ง ซึ่งอัตราการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในการหมักโดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบนั้นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 30 องศาเซลเซียสถึง 33 องศาเซลเซียสแต่จะลดลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลที่คล้ายกันนี้ถูกพบในการหมักโดยใช้อาหารสังเคราะห์และพบว่าผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญและการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ในการหมักแบบกะของ *C. acetobutylicum* คือ ผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวมมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเพราะการลดลงของการผลิตอะซิโตนและพบว่าบิวทานอลจะไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิในรูปของผลผลิตตัวทำละลายอินทรีย์รวมและอัตราการผลิต ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์คือ 35 องศาเซลเซียส

2.2.4.3 ออกซิเจน

C. acetobutylicum ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหมักที่มีความต่างศักย์ของศักย์ภาพการเกิดออกซิเดชัน-รีดักชัน ในช่วงระหว่าง -250 มิลลิโวลต์ถึง 400 มิลลิโวลต์ การสัมผัสกับออกซิเจนใน การหมักแบบไร้ออกซิเจนไม่เป็นอันตรายถ้าเกิดขึ้นเพียงระยะสั้นๆ อย่างไรก็ตามถ้าหมักสัมผัสกับ ออกซิเจนในปริมาณมากๆ (40 ถึง 60 ไมโครเมตร) การใช้น้ำตาลกลูโคสของจุลินทรีย์จะลดผลการเจริญการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน จะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีอากาศ จุลินทรีย์จะมีการผลิตอะซิเตท แต่ไม่ผลิตอะซิโตน หรือมีการผลิต

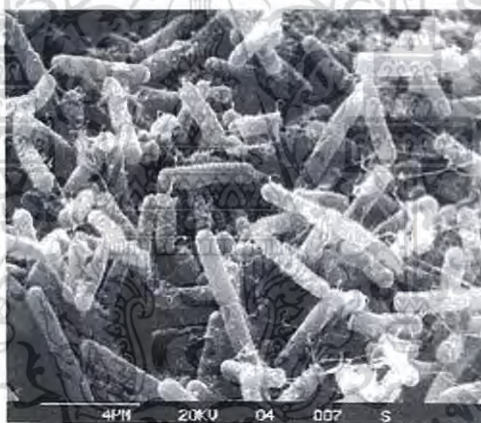
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลงรวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วยส่งผลของออกซิเจนคือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมดการเจริญและเมแทบอลิซึมจะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนอีก

2.2.4.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และผลิตภัณฑ์กรดในขั้นตอนสุดท้าย

ในน้ำหมักค่า pH จะเป็นตัวกำหนดการย่อยสลายของน้ำตาล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่า ถ้ารักษาค่าพีเอชของน้ำหมักไว้ที่ค่าสูงๆ ในทางตรงกันข้ามถ้ารักษา pH ไว้ที่ค่าต่างๆผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามช่วงของ pH ที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ใน ช่วงกว้างมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วยช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์มักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมอย่าง *C. acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วง pH 6.5

2.3 *Clostridium acetobutylicum*



รูปที่ 2.3 *Clostridium acetobutylicum*

ที่มา : <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/26> (10/12/2558)

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เป็นไปดังต่อไปนี้ (มณฑนา และคณะ, 2555)

Kingdom : Bacteria

Division : Firmicutes

Class : Clostridia

Order : Clostridiales

Family : Clostridiaceae

Genus : *Clostridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งาน Species : *C. acetobutylicum* ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ได้ เซลล์มีความยาวตั้งแต่ 3-8 ไมโครเมตร และกว้าง 0.4-1.2 ไมโครเมตร เป็นพวก obligate anaerobes หรือมีบางพวกเป็น Aerotolerant ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว สปอร์จะไม่งอกถ้าขาดสภาพที่เหมาะสม คือ สภาพไร้ออกซิเจน สปอร์ทนความได้ดี สามารถทนอุณหภูมิถึง 120°C ได้นานถึง 10-15 นาที สปอร์เป็นรูปไข่อยู่ก่อนไปทางปลายเซลล์ ติดสีแกรมบวก ลักษณะโคโลนีไม่สม่ำเสมอ มีสีขาวเทา โปรงแสง และเป็นมัน เจริญได้ในอาหาร NB แต่ถ้าอาหารมีคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อต้องการอยู่ เชื้อจะเจริญได้ดี ผลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทิริก สร้างอะซิโตน และบิวทานอล สามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนได้ พบทั่วไปในดิน การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยส่วนใหญ่ใช้การเลี้ยงใน Blood agar และ Egg yolk agar ในสภาพไม่มีอากาศเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โคโลนีจาก Blood agar สามารถนำมาตรวจดูปฏิกิริยาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจากลักษณะโคโลนี ส่วนเชื้อที่เจริญใน Egg yolk agar สามารถตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lecithinase โดยดูจากลักษณะการตกตะกอนขุ่นขาวในเนื้อวุ้น และตรวจหาการทำงานของเอนไซม์ Lipase โดยดูจากความเป็นเงา (Iridescent sheen) ที่ผิวหน้าเชื้อ

Clostridium acetobutylicum อยู่ในจีนัส *Clostridium* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเชิงการค้าอย่างมาก บางครั้งสามารถเรียกแบคทีเรียชนิดนี้ว่า “Wiezmann Organism” ซึ่งเป็นชื่อที่ตั้งตาม Chiam Wiezmann ที่ค้นพบแบคทีเรียชนิดนี้ในปี ค.ศ. 1916 เขายังค้นพบอีกว่า *Clostridium acetobutylicum* นั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแป้ง โดยใช้กระบวนการ ABE (Acetone Butanol Ethanol process) ในงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตดินปืน และดินระเบิด กระบวนการ ABE กลายมาเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรม จนกระทั่งปลายปี ค.ศ. 1940 เมื่อน้ำมันมีราคาตกลง ทำให้มีผลกระทบต่อกระบวนการพื้นฐานของการแยกไฮโดรคาร์บอน และเทคนิคการกลั่นปิโตรเลียม นอกจากนั้น *C. acetobutylicum* ยังสามารถผลิตกรดบิวทิริก กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนได้อีกด้วย

2.4 ข้าวโพด (Indian Corn หรือ Maize)

2.4.1 ประวัติของข้าวโพด

ข้าวโพด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* เป็นพืชตระกูลเดียวกับหญ้ามีลำต้นสูง โดยเฉลี่ย 2.2 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 0.5-2.0 นิ้ว (รูปที่ 2.4) ถิ่นกำเนิดแรก พบจากการขุดพบซึ่งข้าวโพดและซากของต้นข้าวโพดที่ใกล้แม่น้ำในรัฐทางตอนตะวันตกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา ติดกับประเทศเม็กซิโก และปัจจุบันนิยมปลูกแพร่หลายในแถบอเมริกา แคนาดา ฯลฯ สามารถปลูกได้ในสภาพที่ภูมิอากาศแตกต่างกันมาก ๆ เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์ เพราะสามารถนำมาเลี้ยงสัตว์ได้ทั้งต้น ใบ และเมล็ด (พันทิพา, 2548; วิจิตรา และคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในประเทศไทยมีหลักฐานทางประวัติศาสตร์บันทึกไว้ว่า ชาวโปรตุเกสได้นำพันธุ์ข้าวโพดมาปลูกในประเทศไทยในช่วงสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี ข้าวโพดที่มีปลูกกันในประเทศไทยเป็นชนิดหัวแข็ง (flint corn) และมีสีเหลืองเข้มแต่เมล็ดมีขนาดเล็กมาก เป็นพันธุ์ที่นำมาจากอินโดจีนต่อมาหม่อมเจ้าสิทธิพร กฤดากร อดีตอธิบดีกรมเพาะปลูกซึ่งได้ลาออกไปทำฟาร์มส่วนตัวที่ตำบลบางเบิด อำเภอสะพานใหญ่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อประมาณปี พ.ศ. 2463 ได้ทดลองสั่งพันธุ์ข้าวโพดไรชนิดหัวบุบ (dent corn) มาจากสหรัฐอเมริกาโดยหม่อมเจ้าสิทธิพร กฤดากร และทดลองปลูกเป็นครั้งแรกในประเทศไทยจำนวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์นิโคลสันเยลโลเดนต (nicholson's yellow dent) ซึ่งมีเมล็ดสีเหลือง และพันธุ์เม็กซิกันจูน (mexican june) ซึ่งมีเมล็ดสีขาว โดยได้ทดลองปลูกที่ฟาร์มบางเบิด เมื่อประมาณปี พ.ศ. 2467 เพื่อใช้เมล็ดเลี้ยงไก่ไข่ขายส่งตลาดกรุงเทพฯ และเลี้ยงสุกรขายตลาดป็นัง นอกจากนี้ยังได้ส่งไปขายเป็นอาหารไก่ในประเทศญี่ปุ่นอีกด้วย ต่อมาเมื่อปี พ.ศ. 2469 โรงเรียนฝึกหัดครูประถมกสิกรรมของกระทรวงศึกษาธิการ ภายใต้การควบคุมของพระยาเทพศาสตร์สถิตย์ ซึ่งตั้งอยู่ตำบลบางสะพานใหญ่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ได้นำไปทดลองปลูกที่โรงเรียนก็ได้ผลดีมาก และได้นำข้าวโพดทั้ง 2 พันธุ์มาปลูกแบบการค้าเป็นการใหญ่ โดยใช้เครื่องมือหุนแรงต่างๆ ปรากฏว่าได้ฝึกใหญ่และงามดีมาก ต่อมาโรงเรียนฝึกหัดครูกสิกรรมแห่งนี้ได้ทำการปลูกข้าวโพดทั้ง 2 พันธุ์เป็นการค้าเรื่อยมาเป็นเวลาหลายปีและเมล็ดพันธุ์ก็ได้แพร่หลายไปในจังหวัดใกล้เคียง เช่น ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา โดยได้คัดเลือกและเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้เอง และได้รู้จักชื่อกันในชื่อข้าวโพดพันธุ์ม้าหรือข้าวโพดพันธุ์ปากช่อง ซึ่งต่อมาได้แพร่หลายไปตามแหล่งต่างๆ และในปี พ.ศ. 2494 ได้มีการส่งข้าวโพดจากประเทศอินโดนีเซียเข้ามาปลูก เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง เกษตรกรนิยมปลูกอย่างแพร่หลาย ต่อมามีการปรับปรุงพันธุ์ที่ด้านทานโรคราน้ำค้าง คือพันธุ์สุวรรณ 1 และส่งเสริมให้ปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518 เป็นต้นมา (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

2.1.2 ลักษณะทั่วไป และลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ราก รากแรกที่ย่อออกมาจากคัพพะ (embryo) เป็นรากชั่วคราวเรียกว่า ไพรมารี (primary) หรือ เซมินัล (seminal) หลังจากข้าวโพดเจริญเติบโตได้ประมาณ 7-10 วัน รากถาวรจะงอกขึ้นรอบส่วนปลาย ในระดับใต้พื้นดินประมาณ 1-2 นิ้ว รากถาวรนี้ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะแผ่ออกไปโดยรอบประมาณ 100 เซนติเมตร และแทงลึกลงไปในดินแนวตั้งยาวมากซึ่งอาจยาวถึง 300 เซนติเมตร รากของข้าวโพดเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) นอกจากรากที่อยู่ใต้ดินแล้ว ยังมีรากยึดเหนี่ยว (bracer root) ซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ ข้อที่อยู่ใกล้ผิวดิน และบางครั้งรากพวกนี้ยังช่วยยึดพื้นดินอีกด้วย ลำต้น ข้าวโพดมีลำต้นแข็ง ใสนั่นไม่กลวง มีความยาวตั้งแต่ 30 เซนติเมตร จนถึง 8 เมตรแล้วแต่ชนิดของพันธุ์ ตามลำต้นมีข้อ (node) และปล้อง (internode) ปล้องที่อยู่ในดินและใกล้ผิวดินสั้น และจะค่อย ๆ ยาวขึ้นไปทางด้านปลาย ปล้องเหนือพื้นดินจะมีจำนวนประมาณ 8-20 ปล้อง พันธุ์

ข้าวโพดส่วนมากลำต้นสดมีสีเขียว แต่บางพันธุ์มีสีม่วง ข้าวโพดแตกกอไม่มากนัก ส่วนมากไม่แตกกอ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ แล้วแต่ชนิดพันธุ์และสิ่งแวดล้อม ข้าวโพดที่แตกกอได้ 3-4 ต้น เช่น ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดที่ปลูกในที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลมาก ๆ อาจแตกกอได้ตั้งแต่ 7-10 ต้น (Koopmans และคณะ, 1996)

ใบ ข้าวโพดมีใบลักษณะยาวรี คล้ายพีชตระกูลหญ้าทั่วไป ประกอบด้วยตัวใบ กาบใบ และเขี้ยวใบ ลักษณะของใบรวมทั้งสีของใบแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิดของพันธุ์ บางพันธุ์ใบสีเขียว บางพันธุ์ใบสีม่วงและบางพันธุ์ใบลายจำนวนใบอาจมีตั้งแต่ 8-48 ใบ (Koopmans และคณะ, 1996)

ดอก ข้าวโพดจัดเป็นพวกโมโนอิคีเชียส (monoecious) คือ มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกอยู่ในต้นเดียวกัน (รูปที่ 2.1) ช่อดอกตัวผู้ (tassel) อยู่ตอนบนสุดของลำต้น ดอกตัวผู้ดอกหนึ่งจะมีอับเกสร (anther) 3 อับ แต่ละอับจะมีเรณูเกสร (pollen grain) ประมาณ 2,500 เม็ด ดังนั้นข้าวโพดต้นหนึ่ง จึงมีเรณูเกสรอยู่เป็นจำนวนหลายล้าน และสามารถปลิวไปได้ไกลกว่า 2,000 เมตร ส่วนดอกตัวเมียอยู่รวมกันเป็นช่อ เกิดขึ้นตอนช่อกกลาง ๆ (Koopmans และคณะ, 1996)

ลำต้น ต้นหนึ่งอาจมีหลายช่อแล้วแต่ชนิดพันธุ์ (รูปที่ 2.4) ดอกตัวเมียแต่ละดอกประกอบด้วยรังไข่ (ovary) และเส้นไหม (silk หรือ style) ซึ่งมีความยาวประมาณ 5-15 เซนติเมตร และยื่นปลายโผล่ออกไปรวมกันเป็นกระจุกอยู่ตรงปลายช่อดอกซึ่งมีเปลือกหุ้มอยู่ ดอกพวกนี้พร้อมที่จะผสมพันธุ์หรือรับละอองเกสรได้เมื่อเส้นไหมโผล่ออกมา หลังจากได้รับการผสมเส้นไหมจะแห้งเหี่ยวและรังไข่เจริญเติบโตเป็นเมล็ด ช่อดอกตัวเมียที่รับการผสมแล้วเรียกว่า ฝัก (ear) แต่ละฝักอาจมีเมล็ดมากถึง 1,000 เมล็ด แกนกลางของฝักเรียกว่า ชัง (cob) (Koopmans และคณะ, 1996)

ช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมีย (รูปที่ 2.4) อยู่บนต้นเดียวกันแต่ต่างตำแหน่งกัน ช่อดอกเพศผู้เป็นช่อดอกแบบแยกแขนง อยู่ตรงส่วนปลายสุดของลำต้น มีความยาวประมาณ 40 เซนติเมตร มีช่อดอกย่อยแตกแขนงออกจากแกนกลางจำนวนหลายช่อ มีช่อดอกย่อยแบบช่อเชิงหลั่น เจริญออกมาจากทางด้านข้างของช่อย่อยเหล่านี้ ช่อย่อยที่แยกแขนงออกมานี้ประกอบด้วย ช่อดอกย่อยที่ไม่มีก้านดอกย่อย 1 ช่อ และช่อดอกย่อยที่มีก้านดอกสั้นๆ 1 ช่อ แต่ละช่อมีความยาว 8-13 เซนติเมตร ประกอบด้วยกาบช่อย่อย 2 กาบ และดอกย่อย 2 ดอก แต่ละดอกมีกาบล่างรูปไข่ 1 กาบ กาบบนผอมบาง 1 กาบ กลีบเกล็ดอ่อนนุ่ม 2 กลีบ เกสรเพศผู้ 3 อัน (Koopmans และคณะ, 1996)



รูปที่ 2.4 ลักษณะส่วนต่างๆ ของข้าวโพด (*Zea mays*) 1. ส่วนโคนลำต้น 2. ส่วนกลางลำต้นที่มีช่อดอกเพศเมียเจริญออกมา 3. ส่วนปลายยอดสุดของลำต้นที่มีช่อดอกเพศผู้ 4. ฝักแก่ที่เจริญจากช่อดอกเพศเมีย

ที่มา : Koopmans และคณะ (1996)

ช่อดอกเพศเมีย เป็นแบบช่อเชิงหลั่น มีประมาณ 1-3 ช่อต่อต้น พัฒนาขึ้นมาเป็นบริเวณซอกใบของใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งอยู่ที่ระดับกึ่งกลางความสูงของลำต้น ประกอบด้วยดอกย่อยที่ไม่มีก้านดอกย่อยอยู่ติดกันเป็นคู่ มีกาบช่อดอก 2 กาบ หุ้มดอกย่อยทั้งสองไว้ ดอกย่อยที่อยู่ด้านล่างเป็นหมัน ดอกย่อยที่อยู่ทางด้านบนมีกาบล่างและกาบบนขนาดใหญ่ มีเกสรเพศเมีย 1 อัน ประกอบด้วยรังไข่ 1 อัน และก้านเกสรเพศเมียที่เป็นเส้นผอมยาว เรียกว่าเส้นไหม อาจยาวได้ถึง 45 เซนติเมตร ซึ่งเจริญโผล่ออกมาทางด้านบนของช่อดอก ช่อดอกเพศเมียที่ดอกย่อยได้รับการปฏิสนธิแล้วจะพัฒนาเป็นฝัก ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกนอก

ฝัก มีความยาวประมาณ 10 - 20 เซนติเมตร กว้าง 3 - 7.5 เซนติเมตร เกิดจากดอกตัวเมียที่เจริญเติบโตแล้ว ข้าวโพดต้นหนึ่งสามารถที่จะให้ฝักมากกว่าหนึ่งฝักก็ได้ ฝักข้าวโพดหุ้มด้วยกาบบางหลายชั้น ฝักอ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีนวล ซึ่งเรียกว่า เปลือกข้าวโพด ส่วนฝักข้าวโพดจะประกอบไปด้วยช่ข้าวโพด (cob) ซึ่งเป็นที่สำหรับให้ผลที่เรียกว่าเม็ดเกาะ

ผล จะเป็นทรงกระบอกยาว เป็นผลแบบธัญพืช (caryopsis) แต่นิยมเรียกว่าเมล็ด ในฝัก 1 ฝักมีเม็ดเกาะอยู่ประมาณ 8 แถว แต่ละแถวจะมีจำนวนประมาณ 30-100 เมล็ดต่อฝัก ลักษณะรูปร่างคล้ายรูปไข่กลับแผ่แบน มีสีขาวย เหลืองอ่อน เหลืองสด เหลืองเข้ม แดง ม่วง และเกือบดำ (Koopmans และคณะ, 1996) ดังรูปที่ 2.4 และ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 ส่วนต่างๆ ของลำต้นข้าวโพดหวานที่ประกอบด้วยใบ ช่อดอกเพศเมีย ช่อดอกเพศผู้ และฝัก ที่มีผลและเมล็ดติดอยู่ โดยมีเปลือกหุ้มฝักไว้หลายชั้น
ที่มา : Koopmans และคณะ (1996)

2.4.3 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ซังข้าวโพด (corn cob) คือแกนของฝักข้าวโพด หลังจากที้นำฝักข้าวโพดไปกระเทาะเอาเมล็ดข้าวโพดออกแล้ว ดังรูปที่ 2.6 ซึ่งจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งในประเทศไทยมักจะพบซังข้าวโพดกองอยู่ทั่วไป ตามพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกข้าวโพด โดยซังข้าวโพดแทบจะไม่มีประโยชน์ เพราะเนื่องจากเมื่อนำไปใช้ทำปุ๋ยหมักก็ย่อยสลายยาก ฉะนั้นในบางพื้นที่เกษตรกรจึงปล่อยให้กองเป็นภูเขา การเผาจึงเป็นวิธีกำจัดซังข้าวโพดอย่างไม่มีทางเลือก ต่อมาจึงมีการทำเป็นถ่านอัดแท่งจากซังข้าวโพด แต่ก็มีอยู่ในวงจำกัด การปล่อยให้ซังข้าวโพดให้ย่อยสลายไปเองโดยจุลินทรีย์ ใช้เวลานาน และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กลับคืนสู่บรรยากาศ ส่วนการเผาซังข้าวโพดเป็นวิธีการกำจัดที่เร็ว แต่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ชั้นบรรยากาศเช่นกัน (นัย, 2555; วิเชียร และคณะ, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ชั่งข้าวโพด

ที่มา : <https://www.exoticblanks.com/Corn-Cob-Pen-Blanks-Stabilized-Large.html>
(15/02 2559)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง ยางพารา และน้ำมันปาล์ม เป็นต้น โดยที่ผลผลิตทางการเกษตรบางชนิดเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศ ทำรายได้ให้กับประเทศหลายล้านบาท ซึ่งในการเก็บเกี่ยวผลผลิตและแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรเหล่านี้ก่อให้เกิดชีวมวลหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ชั่งข้าวโพด เศษไม้ยางพารา ฟางข้าว เหง้ามันสำปะหลัง และขานอ้อย เป็นต้น (พชร และคณะ, 2554)

เนื่องจากข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย และข้าวโพดเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศ รวมถึงใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกไม่นาน ทำให้เป็นพืชไร่ที่เกษตรกรนิยมปลูก ซึ่งข้าวโพด 1 ไร่จะได้น้ำหนักประมาณ 90 - 100 กิโลกรัม และผลผลิตต่อไร่ประมาณ 1,100 - 1,800 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อนำฝักมากระเทาะเมล็ดก็จะเหลือชั่งข้าวโพด กลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรจำนวนมาก โดยจะมีผลพลอยได้เหล่านี้ทั้งในช่วงต้นฤดูฝน ปลายฤดูฝน และต้นฤดูร้อน (พิเชษฐ์ และคณะ, 2555; คณิงศักดิ์ และคณะ, 2555) คุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพดในแต่ละส่วน ก็จะมี ความแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.3

องค์ประกอบที่สำคัญที่จะเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างชั่งข้าวโพดให้สูงขึ้น โดยจะเพิ่มมูลค่าด้วยการใช้เทคโนโลยีเพื่อเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่พบในพืชให้เป็นน้ำตาล เพื่อนำน้ำตาลไปใช้งานต่อ ซึ่งส่วนประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยที่เซลลูโลส จะประกอบด้วยกลูโคสสายโมเลกุลยาว อยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว และไม่ละลายน้ำ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบินโนส (Arabinose)

เป็นต้น ตลอดจนสาร acetyl เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีการแตกกิ่งมาก และไม่เป็นผลึก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนอกจากนั้นยังมีส่วนประกอบของพืชอื่นๆอีก ได้แก่ ลิกนินที่เป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ที่ไมไคคาร์โบไฮเดรตที่ยึดเหนี่ยวผนังเซลล์ของพืชเข้าด้วยกัน ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างความแข็งแรงให้แก่พืช (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549; บุญยมาศ, 2554)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพด

องค์ประกอบ	ส่วนประกอบภายในข้าวโพด (ร้อยละวัตถุดิบแห้ง)		
	เมล็ดข้าวโพด	ข้าวโพดทั้งฝัก	ชังข้าวโพด
วัตถุดิบแห้ง	85.0	86.1	-
โปรตีนย่อยได้	6.7	5.3	1.16
โภชนะที่ย่อยได้รวม	80.1	73.2	-
โปรตีนรวม	8.7	7.5	2.1
ไขมัน	3.9	3.2	0.8
เยื่อใย	6.2	8.0	36.5
คาร์โบไฮเดรต	60.2	66.3	57.8
เถ้า	1.2	1.3	2.8
แคลเซียม	0.32	1.02	0.05
ฟอสฟอรัส	0.27	0.22	0.06

ที่มา : จินดา (2536)

โดยปกติปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ

ชีวมวล	ส่วนประกอบภายในเซลล์พืช (ร้อยละ)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าว	32.1	24	12.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18
ชานอ้อย	33.4	30	18.9
ชังข้าวโพด	45	35	15
ต้นปาล์ม	37.14	30.59	22.32
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96

ที่มา : พรรณวิไล (2545)

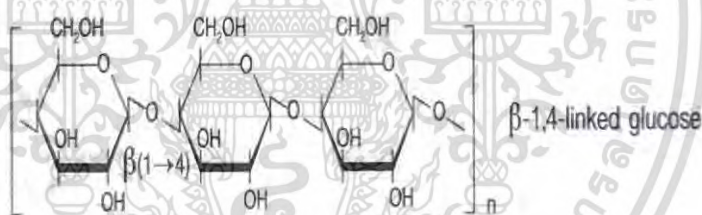
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสหมายถึงชีวมวลอินทรีย์ที่ประกอบด้วยเซลลูโลสเฮมิเซลลูโลสและลิกนินพบมากในผนังเซลล์ของพืชได้แก่เศษวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เศษวัสดุจากการเกษตรเช่นชังข้าวโพดเส้นใยข้าวโพดชานอ้อยแกลบและพวกฟางข้าวชยะจากกระบวนการแปรรูปอาหารและจากบ้านเรือนรวมถึงมูลสัตว์ต่างๆ

2.4.4.1 เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสหมายถึงพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากในผนังเซลล์พืชซึ่งเป็นสารโพลีเมอร์ที่เกิดจาก D-กลูโคสต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 2.7) ช่วยทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรงป้องกันการแตกของเซลล์ ถึงแม้ว่าเซลลูโลสจะประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสเหมือนกับแป้งแต่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดบีตา (β -1,4 - glycosidic bonds) เอนไซม์อะไมเลสจึงไม่สามารถย่อยได้เซลลูโลสไม่สามารถละลายน้ำได้และไม่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยกเว้นสัตว์กินพืชเท่านั้นที่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นพลังงานเพราะสัตว์กลุ่มนี้มีจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนซึ่งมีเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในกระเพาะสำหรับย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคสได้ มีการประเมินกันว่าทั่วโลกพืชสามารถผลิตเซลลูโลสได้มากถึง 100 พันล้านตันในแต่ละปี (Ezeji และคณะ, 2007)



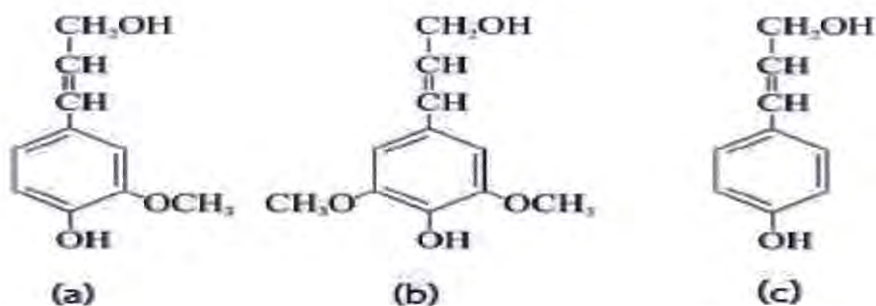
รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส

ที่มา : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/> (8/ 01/ 2559)

2.4.4.2 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน (Lignin) ลิกนินเป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกที่พบในส่วนผนังเซลล์ของพืชพบในปริมาณที่แตกต่างไปตามชนิดของพืชในธรรมชาติลิกนินเป็นส่วนป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติไม่แตกผลึก (Cheng และคณะ, 2008) ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิดประกอบด้วย *trans-p-coumaryl alcohol*, *trans-coniferylalcohol* และ *trans-p-sinapyl alcohol* (Eriksson และคณะ, 1990) นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นอีกมากมายเช่น *vanillin* และ *syringaldehyde* (Yudkin และ Offord, 1993) สูตรโครงสร้างของ *trans-p-coumaryl alcohol*, *trans-coniferylalcohol* และ *trans-p-sinapyl alcohol* แสดงดังรูปที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 สูตรโครงสร้างของ (a) trans-coniferylalcohol (b) trans-p-sinapyl alcohol และ (c) tran-p- coumaryl alcohol

ที่มา : Eriksson และคณะ (1990)

2.4.4.3 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ของพืชเช่นกันแต่เป็นสารโพลีเมอร์ของพวก D-ไซโลส ซึ่งมีแขนงข้างเป็นน้ำตาลอะราบินโนสหรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ มีสายสั้นกว่าเซลลูโลสส่วนลิกนินเป็นสารประกอบโพลีเมอร์อโรมาติกที่ไม่มีรูปผลึกจะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใยทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกันโครงสร้างพื้นฐานของลิกนินคือ phenylpropane ลิกนินไม่สามารถถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนแต่จะถูกย่อยสลายได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยพวกเชื้อราประเภท white rot fungi และ moulds (Weber และคณะ, 2010)

2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการย่อย (Pretreatment)

เซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นจะอยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) กับลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส แต่ส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เนื่องจากส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง อีกทั้งลิกนินในปริมาณมากจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควรและยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิต คือ เพื่อแยกลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยวิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธี (ดังรูปที่ 2.9) คือ

(1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด หรือการใช้ความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

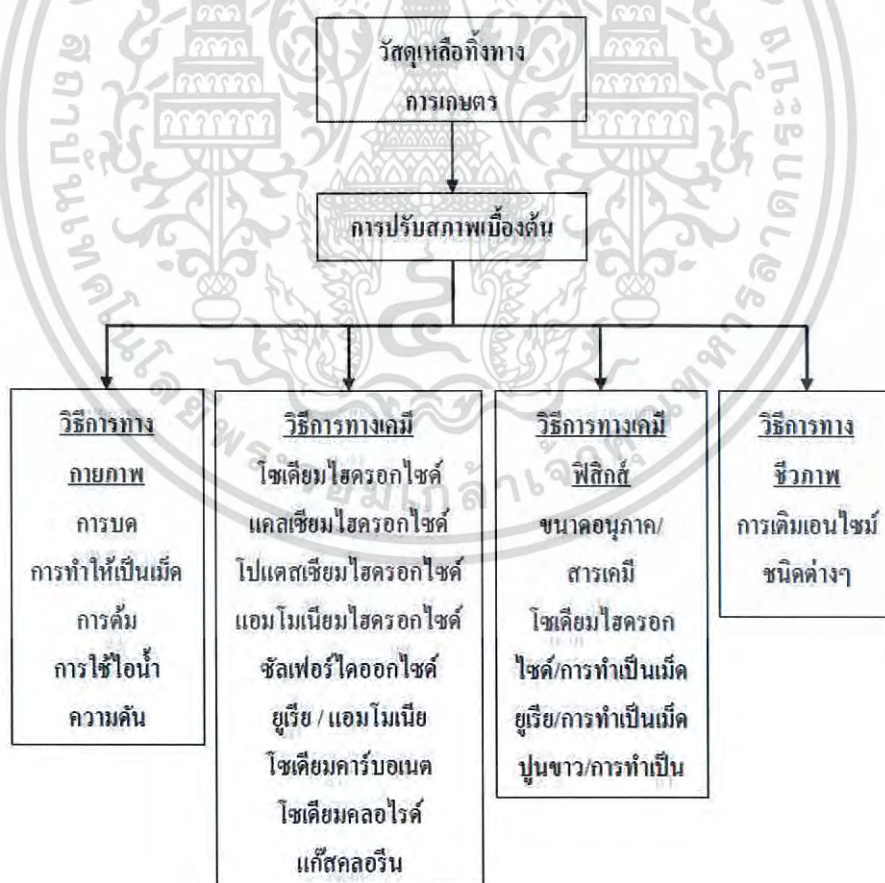
เป็นการใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน หรืออาจใช้สารละลายแอมโมเนียเพื่อกำจัดลิกนิน

(3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical Pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน

(4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จาก จุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก



รูปที่ 2.9 วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ

ที่มา : พรรณวิไล (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมเซลล์ูโลส (Pretreatment) มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลล์ูโลส รวมทั้งลดการเป็นผลึกของเซลล์ูโลส และเพิ่มการเป็นรูปพรุนของวัตถุดิบการปรับสภาพต้องทำเพราะว่า สารพอลิกลีโนเซลล์ูโลสเป็นสารที่มีความแข็งแรง และยากต่อการย่อยสลาย จึงจำเป็นต้องมีการเตรียมการให้อ่อนนุ่มลง เพื่อให้เอนไซม์เข้าถึงและทำปฏิกิริยาได้ดี (จีอีอี เมเนจเมนท์ จำกัด, 2555)

2.5.1 วิธีการเตรียมทางกายภาพ (Physical pretreatment)

(1) Mechanical Comminution

เป็นการลดขนาดวัตถุดิบโดยวิธีการตัด การบด เพื่อลดความเป็นผลึกของเซลล์ูโลสและเพิ่มการย่อยสลายได้ ขนาดที่ได้จากการตัดจะมีขนาดประมาณ 10-30 มิลลิเมตร ส่วนขนาดที่ได้จากการบดมีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun และ Cheng, 2002)

(2) Pyrolysis

เป็นกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบที่อุณหภูมิสูงประมาณ 200-600 องศาเซลเซียส เป็นกระบวนการทางเคมีที่ผันกลับไม่ได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไพโรไลซิสขึ้นกับธรรมชาติของวัตถุดิบ เวลา อุณหภูมิ ขนาดอนุภาค โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ ถ่านร้อยละ 30 - 50 ก๊าซร้อยละ 20 ของเหลวที่เป็นสารอินทรีย์ร้อยละ 18 - 20 เช่น กรดอะซิติก การเตรียมลิกโนเซลล์ูโลสโดยกระบวนการไพโรไลซิสที่อุณหภูมิสูงมากกว่า 300 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์ูโลสสลายตัวอย่างรวดเร็ว ได้ก๊าซและถ่าน เมื่อนำถ่านไปไฮโดรไลซิสจะทำให้ลิกโนเซลล์ูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 80 - 85 และมีกลูโคสมากกว่าร้อยละ 50 (Sun และ Cheng, 2002)

2.5.2 วิธีการเตรียมทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical pretreatment)

(1) Steam explosion (astohydrolysis)

การระเบิดวัตถุดิบด้วยไอน้ำ เป็นเทคนิคการใช้ไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความดันสูง ในการใช้เวลานั้นมากสำหรับแยกวัสดุ เป็นเทคนิคที่ใช้เตรียมลิกโนเซลล์ูโลส โดยจะเริ่มที่อุณหภูมิสูงประมาณ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 มิลลิปาสคาล เป็นเวลาหลายวินาทีจนถึงสามนาที (Sun และ Cheng, 2002)

(2) Ammonia fiber explosion (AFEX)

เป็นการนำวัตถุดิบใส่ในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงและความดันสูงจากนั้นลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะคล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ ใช้แอมโมเนีย 1-2 กิโลกรัมต่อวัตถุดิบ 1 กิโลกรัม อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถใช้กับฟางข้าว ชังข้าวโพด หญ้า พืชตระกูลถั่ว เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) CO₂ explosion

คล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการระเบิดด้วยแอมโมเนีย โดย CO₂ จะเหมือนกับกรดคาร์บอนิก สำหรับพืชตระกูลถั่วใช้ 1 กิโลกรัม CO₂ ต่อไฟเบอร์ 1 กิโลกรัม ความดัน 5.62 มิลลิปาสคาล และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้กลูโคสร้อยละ 75 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (Sun และ Cheng, 2002)

2.5.3 วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)

(1) Ozonolysis

โอโซนสามารถสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุบดได้หลายชนิด แต่ไม่สลายเซลลูโลส ไม่ผลิตสารที่เป็นพิษ ปฏิกริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีข้อด้อยคือมีราคาแพง (Sun และ Cheng, 2002)

(2) Acid pretreatment

ใช้กรด เช่น Sulfuric acid และ Hydrochloric acid ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลส แต่กรดมีข้อด้อยคือความเป็นพิษและฤทธิ์กัดกร่อน จำเป็นต้องใช้ถังปฏิกรณ์ที่ทนการกัดกร่อน ปัจจุบันมีการใช้กรดเจือจางในการสลายลิกโนเซลลูโลส แต่มีข้อด้อยที่ต้นทุนสูงและอาจมีผลในขั้นตอนการหมัก (Sun และ Cheng, 2002)

(3) Alkaline pretreatment

การใช้เบส เช่น การใช้แอมโมเนียไฮดรอกไซด์เจือจางเตรียมลิกโนเซลลูโลส จะทำให้เส้นใยพองตัว เพิ่มพื้นที่ผิว ลดความเป็นผลึก สลายการเป็นพอลิเมอร์ สลายโครงสร้างลิกนิน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถลดลิกนินของไม้เนื้อแข็งจากร้อยละ 24 - 55 ได้เหลือเพียงร้อยละ 20 แต่การใช้กรดเจือจางสามารถลดลิกนินของไม้เนื้อได้มากกว่าคือ ร้อยละ 26 (Sun และ Cheng, 2002)

(4) Oxidative delignification

การสลายลิกโนเซลลูโลสด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การเตรียมขานอ้อยโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 2 สามารถย่อยสลายลิกนินได้ร้อยละ 50 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 8 ชั่วโมง เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้เซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 95 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง (Sun และ Cheng, 2002)

2.5.4 วิธีการเตรียมทางชีวภาพ (Biodegradation pretreatment)

ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการเตรียมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ เช่น ราฟุสีขาบน้ำตาล และราฟุอ่อน ในการสลายลิกนินและเซลลูโลส โดย ราฟุสีขาบ สามารถสลายลิกนินแล้วปล่อยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ulosออกมา ราฟุสีน้ำตาล สามารถสลายเซลล์ulosเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส และยีสต์จะหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลต่อไป (Sun และ Cheng, 2002)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณัฐชา และคณะ(2557) ได้ทำการปรับสภาพซังข้าวโพดและย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด และนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยทำการปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลาง แล้วนำไปผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ต่อกรัมน้ำหนักของซังที่ผ่านการปรับสภาพในอะซีเตดบัพเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับ 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 0.60-0.70 กรัมต่อน้ำหนักของซังที่ปรับสภาพ และนำน้ำตาลที่ได้ไปเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร GYCC ซึ่งนำไปเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ต่อไป

Jiang และคณะ (2014) ทำการเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* IB4 โดยการควบคุมค่า pH ด้วย HCL 2 M หรือ NaOH 2 M พบว่า pH มีผลต่อการผลิตสารละลายอย่างมาก ที่ pH ต่ำ (4.9 และ 5.2) ความเข้มข้นของอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) เป็น 17.37 กรัมต่อลิตร และ 17.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีบิวทานอล 10.52 กรัมต่อลิตร และ 10.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของ ABE มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH แต่เห็นได้ชัดว่าการเพิ่มขึ้นของบิวทานอล ซึ่งแสดงให้เห็นว่า pH ต่ำ (4.9 และ 5.2) ไม่เหมาะต่อการผลิตบิวทานอลด้วย *C. beijerinckii* IB4 ในทางตรงกันข้าม ที่ pH 5.5 และ 6.0 พบว่าการผลิต ABE เพิ่มขึ้นอย่างน่าทึ่ง ที่ pH 6.0 พบ ABE 19.06 กรัมต่อลิตร และบิวทานอล 12.10 กรัมต่อลิตร และที่ pH 5.5 พบว่าการผลิต ABE สูงสุด 24.6 กรัมต่อลิตร และพบบิวทานอล 15.7 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่าค่า pH 5.5 เป็น pH ที่เหมาะแก่การผลิต ABE ด้วยเชื้อ *C. beijerinckii* IB4

Kai และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาการผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE) จากการย่อยซังข้าวโพด เพื่อทำการเพาะเลี้ยง *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ในการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินและล้างซังข้าวโพด จะมีค่าผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดเท่ากับ 917 กรัมต่อกิโลกรัม และนำสารที่ได้จากการย่อยที่ไม่แยกตะกอนออกมาเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต ABE โดยมีปริมาณน้ำตาล 55.22 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ตัวทำละลาย เท่ากับ 19.44 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณบิวทานอลอยู่ถึง 12.27 กรัมต่อลิตร โดยจะคิดเป็นค่าผลได้ของ ABE เท่ากับ 350 กรัมต่อกิโลกรัม และค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมการทดลองเป็นการใช้น้ำตาลหลายชนิดปริมาณ 55.22 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณ ABE เท่ากับ 16.81 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณบิวทานอลถึง 10.26 กรัมต่อลิตร โดยค่าผลได้ของ ABE จะเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูญาติเนาไปไซประยชนตาดนการค
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

300 กรัมต่อกิโลกรัม และอัตราการผลิต เท่ากับ 0.47 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ เพื่อย่อยวัตถุดิบอาจจะเป็นสารกระตุ้นองค์ประกอบเพื่อช่วยปรับปรุงการผลิต ABE

Lijuan และคณะ (2015) ได้ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อยด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (APP) ในสภาวะที่เหมาะสมทั้งความเข้มข้นของสารละลาย โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ระยะเวลา อุณหภูมิ และอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบและสารละลาย (SLR) โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพก่อนการย่อย คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 10 โดยทำการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลของการปรับสภาพก่อนการย่อยนี้จะมีปริมาณเซลลูโลสอย่าง มีนัยสำคัญ 94.56 เปอร์เซ็นต์ และเอมิเซลลูโลส 81.47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลิกนินที่กำจัดออกมีถึง 46.79 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตไปย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 8.39 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์อีก 12 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่ทำการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์ โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น 1.44 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการ ปรับสภาพ และมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นถึง 1.29 เท่า เมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด และเมื่อทำการวิเคราะห์ และประเมินลักษณะทางกายภาพทั้งผลึก และโครงสร้างของซังข้าวโพดที่ ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope; SEM) เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคชัน (X-ray Diffractometer; XRD) เครื่องฟูริเยร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer; FTIR) ซึ่งกระบวนการปรับ สภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตนี้เป็นกระบวนการใหม่ โดยเป็น กระบวนการที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เนื่องจากส่งผลต่อ องค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษนี้คือ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยเก็บรักษาสายพันธุ์ในอาหาร Difco™ Reinforced Clostridial ที่ 20 องศาเซลเซียสและทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

3.1.2 สารเคมี

กลูโคส (Glucose)	ยีสต์สกัด (Yeast extract)
เคซีน (Casein)	Cystein-HCl
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Resazurin
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก 1	ไทอามีน
ไบโอติน	แมกนีเซียมซัลเฟต
แมงกานีสซัลเฟต	ไอโรนซัลเฟต
คลอไรด์	กรดไฮโดรคลอริก
Dinitrosalicylic acid (DNS)	น้ำกลั่น

3.1.3 อุปกรณ์

กระบอกตวง	แอนแอโรบิกจาร์ (Anaerobic jar)
ขวดน้ำกลั่น	เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ขวดเก็บตัวอย่าง
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	ขวดรูปชมพู่
ตู้เย็น	ปีกเกอร์
ตู้อบลมร้อน	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
ตู้อบปลอดเชื้อ	ไฟแช็ค
ตะเกียงแอลกอฮอล์	ลวดเขี่ยเชื้อ
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)	ข้อดักสาร
แท่งแก้วคนสาร	เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
หลอดทดลอง	เครื่องปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปต	เครื่องบดอุตสาหกรรม
ลูกยางดูดสาร	หม้อนึ่งอัตโนมัติ
หลอดปั่นเหวี่ยง	แผ่นตูดอกซิเจน (Anaerobic cult)
จุกสำลี	ออตโตปิเปตต์
ตระแกรงร่อน เบอร์ 50	คิวเวต
เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography)	

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 อาหาร Difco™ Reinforced Clostridial (RCM) ยี่ห้อ Merck เป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาหัวเชื้อของ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ(Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	3.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น	0.5	กรัมต่อลิตร

โดยละลายส่วนผสมปริมาณ 38 กรัม กับน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และทำการปรับปริมาตรของอาหาร RCM ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 อาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose-yeast extract-casein-cystein, GYCC) โดยดัดแปลงมาจาก Badr, Toledo และ Hamdy (2000) มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อ 1 ลิตร ดังนี้

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เคซีน(Casein)	15	กรัมต่อลิตร
Cystein-HCl	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์(NaCl)	2.5	กรัมต่อลิตร
Resazurin	0.001	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส (Glucose)

20-50 กรัมต่อลิตร

ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ในกรณีการเตรียมหัวเชื้อ และในกรณีการทดลอง เพื่อศึกษาผลของวิตามินและแร่ธาตุ และการทดลองชุดควบคุม ใช้ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชให้ได้ 6.8 และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการศึกษาผลการใช้สารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพด ใช้สารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรแทนกลูโคส

3.2.3 สารละลายวิตามิน

เตรียมได้จากส่วนประกอบต่อไปนี้ กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ไบโอดีน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร (Chen และคณะ, 2013) นำสารละลายวิตามินไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมโครเมตร

3.2.4 สารละลายแร่ธาตุ

ส่วนประกอบของสารละลายแร่ธาตุ ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร ไอรอนซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร และคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร (Chen และคณะ, 2013) นำสารละลายแร่ธาตุไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมโครเมตร

นำสารละลายวิตามินและแร่ธาตุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปเติมในอาหาร GYCC ที่เตรียมได้ในหัวข้อ 3.2.2 เพื่อต้องการศึกษาผลของสารละลายวิตามินและแร่ธาตุต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* โดยเติมให้ถึงความเข้มข้นสุดท้ายเป็นไปตามส่วนประกอบดังกล่าว

3.3 การเตรียมซังข้าวโพดและย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

ซังข้าวโพด ได้จากร้านขายข้าวโพดในตลาดไท อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี นำซังข้าวโพดมาตากแดดให้แห้ง จากนั้นนำไปอบอีกรอบในตู้ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทุบให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดอุตสาหกรรม แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงร่อนเบอร์ 50 (ขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร) จากนั้นใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ ก่อนนำไปปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ (ณัฐชา และคณะ, 2557) โดยใช้อัตราส่วนผงซังข้าวโพดต่อสารละลายเบสเท่ากับ 1 กรัมต่อ 10 มิลลิตรแล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และล้างตะกอนจนกว่าน้ำที่ใช้ล้างจะมีค่าเป็นกลางแล้วนำซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลานำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักแห้งไว้ประโยชน์ด้านการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ และอบแห้ง ด้วยการเติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 (บริษัทสยามวิคตอรีเคมิคอล) ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมของน้ำหนักแห้ง และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ณัฐชา และคณะ, 2557) จากนั้นกรองตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (หัวข้อ 3.8.3)

3.4 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

เริ่มโดยการเตรียมอาหาร reinforced clostridial media (RCM) ในหลอดให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ลูปเขี่ยเชื้อขึ้นมา 1 ลูป ผสมลงในอาหาร RCM 5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมอาหาร GYCC ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำอาหาร RCM 5 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อและผ่านการบ่ม 48 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหาร GYCC ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

3.5 กระบวนการหมัก

ทำการเตรียมอาหารทั้งหมด 4 สูตร คือ GYCC, GYCC เสริมด้วยวิตามินและเกลือแร่, GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส และ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวม 2 ลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำอาหารใส่ในถังหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ต่อถังหมักเข้ากับปั๊มเครื่องทำความเย็น (cooling) ตั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พ่นก๊าซไนโตรเจนเข้าไปในถังหมักเพื่อให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน จนกระทั่งค่าปริมาณออกซิเจนในถังหมักเป็นศูนย์ จากนั้นลงเชื้อจาก pre-culture ที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.4 ร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในถังหมัก พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการควนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดต่าง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์ และปริมาณเซลล์ *C. acetobutylicum* โดยในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 20 มิลลิลิตร (กฤศกา และคณะ, 2553)

3.6 การวิเคราะห์ค่าทางจุลินทรีย์และค่าความเข้มข้นสารเคมี

นำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* เบื้องต้น จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลด้วยวิธี DNS (รายละเอียดในหัวข้อ 3.6.2) และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC (รายละเอียดในหัวข้อ 3.6.3) ส่วนตะกอนเซลล์นำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (รายละเอียดในหัวข้อ 3.6.1) ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตะกอนที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงในหัวข้อ 3.8 มาทำการล้างด้วยน้ำกลั่น โดยเติมน้ำลงในหลอดเอฟเฟนดอร์ฟ แล้วนำไปผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสม vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง นำไประเหยน้ำโดยเอาไปต้มในตู้ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหลอดมาชั่งน้ำหนัก เพื่อกำหนดหาความเข้มข้นของน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม วิเคราะห์น้ำตาลด้วยสารละลาย DNS โดยใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และ DNS 3 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยนำไปแช่ในน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

การวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยนำส่วนที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 2 สำหรับเป็น Internal standard ทำการกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex fermentation monitor ขนาด Particle size 9 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส ความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงใช้ Run time 30 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า แล้วจึงคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.6.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในทุกการทดลอง และการวิเคราะห์ ทำการศึกษาทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าการวัดความขุ่นจากการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และการวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ มาวิเคราะห์ตาราง ANOVA เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

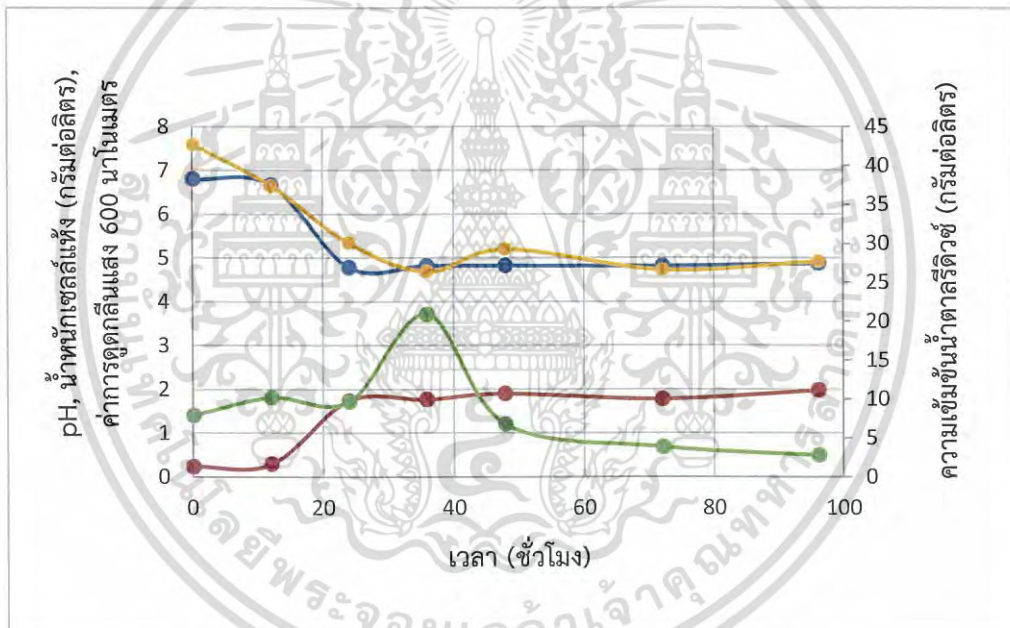
บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหาร GYCC หลัก

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ชนิดต่างๆ โดยทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 5 วัน ในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงนำตัวอย่างมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วัดน้ำหนักเซลล์แห้ง และวิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์

4.1.2 อาหาร GYCC หลัก



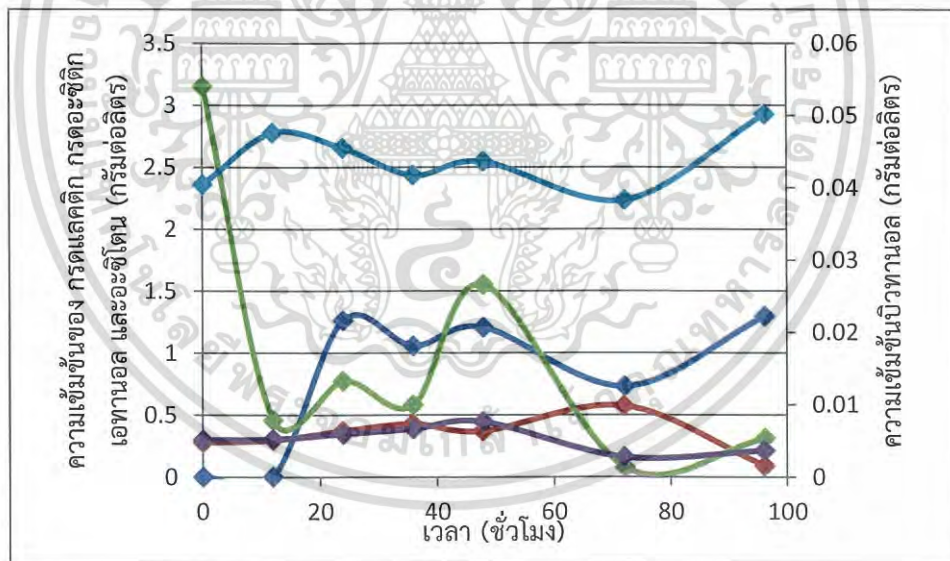
รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C (● ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด, ● ค่าความเป็นกรดต่าง, ● น้ำหนักเซลล์แห้ง, ● ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm	pH
0	1.43 ^{de} ± 0.15	42.67 ^a ± 2.52	0.24 ^d ± 0.06	6.80
12	1.77 ^{de} ± 0.57	37.33 ^b ± 1.53	0.28 ^c ± 0.26	6.66
24	1.70 ^{de} ± 0.52	30.00 ^{cd} ± 2.00	1.73 ^b ± 0.11	4.77
36	3.70 ^d ± 3.30	26.33 ^e ± 1.53	1.73 ^b ± 0.31	4.81
48	1.20 ^e ± 0.36	32.33 ^c ± 1.53	1.90 ^{ab} ± 0.06	4.82
72	0.73 ^e ± 0.12	26.67 ^{de} ± 2.52	1.79 ^b ± 0.01	4.83
96	0.53 ^e ± 0.58	27.67 ^{de} ± 0.58	1.98 ^a ± 0.70	4.88

หมายเหตุ a, b, c, d, e ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเป็นกรดต่างไม่สามารถหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้



รูปที่ 4.2 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (◆ กรดแลกติก, ◆ กรดอะซิติก, ◆ เอทานอล, ◆ อะซิโตน, ◆ บิวทานอล)

จากรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากในชั่วโมงที่ 0 ถึง 36 และเริ่มมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงที่ชั่วโมงที่ 48 จนถึง 96 ซึ่งสัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 และเริ่มลดลงในชั่วโมงต่อมา ส่วนความเป็นกรดต่างมีค่าลดลงที่ 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งทำ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ได้ค่าต่ำสุดเท่ากับ 4.77 นั้นค่าความเป็นกรดต่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ที่ชั่วโมงที่ 36, 48, 72 และ 96 เท่ากับ 4.81, 4.82, 4.83 และ 4.88 ตามลำดับ ส่วนการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดระหว่าง ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 เท่ากับ 0.288 และ 1.73 ตามลำดับ หลังจากนั้นมีความคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 72 และ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 1.79 และ 1.98 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)				
	กรดแลคติก	กรดอะซิติก	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล
0	0.00 ^c ±0.00	0.28 ^{bc} ±0.003	3.15 ^a ±0.04	0.3 ^b ±0.22	0.04 ^{bc} ±0.001
12	0.00 ^c ±0.00	0.30 ^{bc} ±0.02	0.45 ^e ±0.02	0.30 ^b ±0.03	0.05 ^{ab} ±0.004
24	1.26 ^a ±0.04	0.37 ^{ab} ±0.01	0.77 ^c ±0.02	0.35 ^b ±0.02	0.05 ^{abc} ±0.001
36	1.06 ^{ab} ±0.26	0.43 ^{ab} ±0.11	0.58 ^d ±0.12	0.39 ^b ±0.01	0.04 ^{bc} ±0.005
48	1.21 ^{ab} ±0.01	0.37 ^{ab} ±0.004	1.55 ^b ±0.02	0.45 ^a ±0.01	0.04 ^{abc} ±0.001
72	0.74 ^b ±0.65	0.58 ^a ±0.31	0.08 ^g ±0.06	0.17 ^b ±0.29	0.04 ^c ±0.008
96	1.30 ^a ±0.03	0.09 ^c ±0.001	0.32 ^f ±0.01	0.22 ^{ab} ±0.003	0.05 ^a ±0.001

หมายเหตุ: a, b, c, d, e, f, g ในแถวแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารสูตร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแสดงดังรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2 พบว่าในชั่วโมงที่ 0, 12 ไม่พบกรดแลคติก แต่เชื้อเริ่มสร้างกรดแลคติกในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร และที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างพบว่ามีปริมาณแลคติกมากที่สุดเท่ากับ 1.30 กรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์น้ำหมักจะได้ปริมาณกรดอะซิติก โดยมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นคือ 0.28 กรัมต่อลิตร และต่อมาในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณอะซิติกมากที่สุดเท่ากับ 0.58 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณกรดอะซิติกได้ลดลงในช่วงเวลาที่ 96 เหลือเพียง 0.09 กรัมต่อลิตร

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลจะพบว่า ปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ได้ค่าคือ 0.05 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาต่อมาค่าจะเริ่มลดลงจนกระทั่งเวลาที่ 36 ชั่วโมง ได้ค่าปริมาณเอทานอล 0.04 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 ต่อมาค่าปริมาณเอทานอลลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 72 ได้ค่าปริมาณเอทานอลต่ำสุดคือ 0.04 กรัมต่อลิตร และที่ชั่วโมงสุดท้ายปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้นอีกครั้ง ได้ค่าที่สูงสุดคือ 0.05 กรัมต่อลิตร

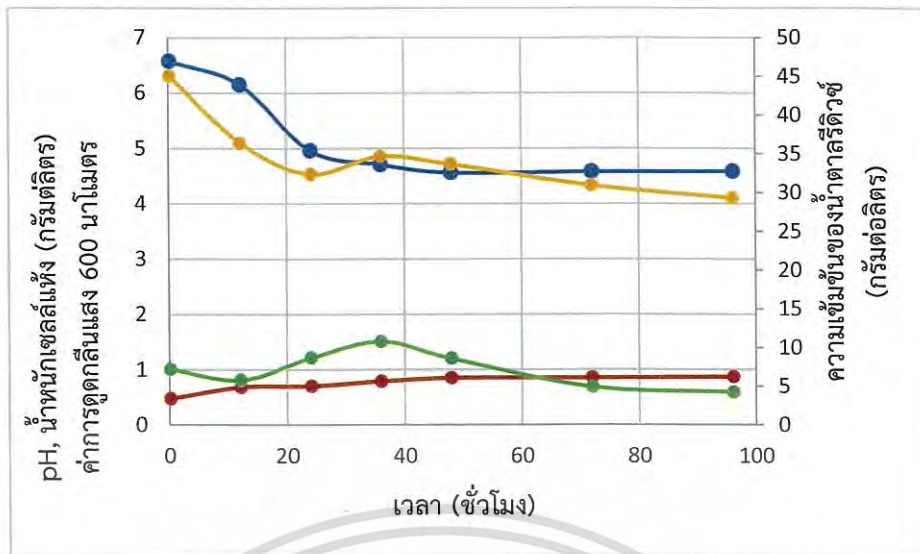
เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปริมาณอะซิโตนพบว่า ในการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงแรกมีปริมาณอะซิโตน 0.30 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 48 พบปริมาณอะซิโตนมีค่ามากที่สุดถึง 0.45 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับปริมาณกรดอะซิติกที่ลดลงในชั่วโมงที่ 48 แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการนำกรดอะซิติกไปใช้ และเปลี่ยนเป็นอะซิโตน ต่อมาปริมาณอะซิโตนได้ลดลงมากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 72 เหลือ 0.17 กรัมต่อลิตรและในช่วงสุดท้ายพบปริมาณอะซิโตนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย 0.22 กรัมต่อลิตร

ปริมาณบิวทานอล พบว่าชั่วโมงแรกๆของการเก็บตัวอย่าง มีปริมาณบิวทานอลคือ 0.04 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงชั่วโมงที่ 12, 24, 36, 48 และพบว่าปริมาณบิวทานอลมีค่าลดลงมากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าน้อยที่สุดคือ 0.04 กรัมต่อลิตร และในช่วงสุดท้ายพบว่ามีปริมาณบิวทานอลเพิ่มขึ้นมากที่สุดคือ 0.05 กรัมต่อลิตร คล้ายกับงานวิจัย Badr และคณะ (2001) ทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยการหมักด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* P-262 โดยใช้อาหาร GYCC (น้ำตาลกลูโคส 40 และ 60 กรัมต่อลิตร) ดำเนินการหมักในถังหมักสภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อผลิตสร้างผลิตภัณฑ์ทั้งหมดเท่ากับ 8.257 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.664 กรัมต่อลิตร, เอทานอล 0.503 กรัมต่อลิตร, บิวทานอล 6.09 กรัมต่อลิตร) และเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เชื้อสร้างสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 7.66 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.54 กรัมต่อลิตร, เอทานอล 0.83 กรัมต่อลิตร, บิวทานอล 5.29 กรัมต่อลิตร)

4.1.2 อาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเกลือแร่

จากรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3 ทำการทดลองโดยใช้อาหาร GYCC ที่เสริมวิตามิน และเกลือแร่ พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลมากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 24 เหลือ 32.33 กรัมต่อลิตร จนชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดเท่ากับ 29.33 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสง และน้ำหนักรเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น โดยค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแรกของการเก็บตัวอย่างได้ค่าเท่ากับ 0.48จนชั่วโมงที่ 12 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.6 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่าสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.9 และค่าน้ำหนักรเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 คือ 1.23 กรัมต่อลิตรจากที่เริ่มต้นเก็บตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.31 กรัมต่อลิตร และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.57 กรัมต่อลิตร ในช่วงชั่วโมงที่ 12 แต่หลังจากชั่วโมงที่ 36 ค่าน้ำหนักรเซลล์แห้งมีค่าแนวโน้มลดลง จนมีค่าน้อยสุดในช่วงชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตรซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 72 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างมีค่าลดลงต่ำสุดที่ชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 4.56 หลังจากนั้นค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.59 และ 4.59 ในช่วงชั่วโมงที่ 72 และ 96 ตามลำดับ



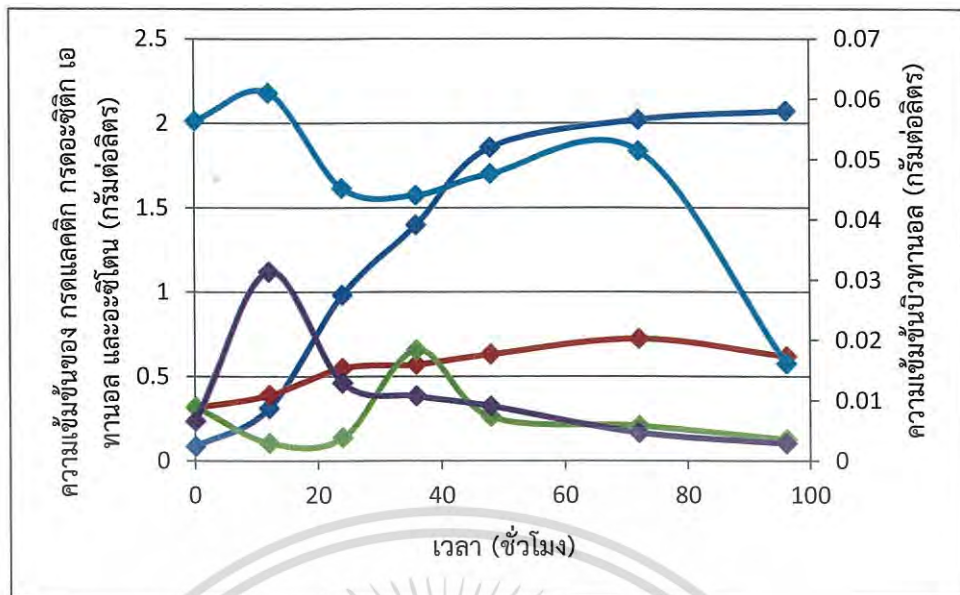
รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C (● ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด, ● ค่าความเป็นกรดต่าง, ● น้ำหนักรวมของน้ำตาลรีดิวซ์, ● ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร)

ตารางที่ 4.3 ค่าน้ำหนักรวมของน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่ มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักรวมของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm	pH
0	0.31 ^c ± 0.80	45.0 ^a ± 1.00	0.48 ^f ± 0.00	6.57
12	0.57 ^{bc} ± 0.23	36.33 ^b ± 1.16	0.68 ^e ± 0.00	6.14
24	1.17 ^{ab} ± 0.21	32.33 ^{de} ± 1.53	0.70 ^d ± 0.01	4.95
36	1.57 ^a ± 0.42	34.67 ^{bc} ± 1.16	0.80 ^c ± 0.00	4.70
48	1.23 ^{ab} ± 0.61	33.67 ^{cd} ± 1.16	0.90 ^b ± 0.00	4.56
72	0.73 ^{bc} ± 0.35	31.00 ^{ef} ± 1.00	0.90 ^b ± 0.01	4.59
96	0.73 ^{bc} ± 0.46	29.33 ^f ± 1.53	0.90 ^a ± 0.01	4.59

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f ในแถวแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเป็นกรดต่างไม่สามารถหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่ (♦ กรดแลคติก, ♦ กรดอะซิติก, ♦ เอทานอล, ♦ อะซิโตน, ♦ บิวทานอล)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)				
	กรดแลคติก	อะซิติก	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล
0	0.08 ^d ± 0.14	0.31 ^c ± 0.04	0.32 ^b ± 0.01	0.23 ^b ± 0.01	0.06 ^a ± 0.001
12	0.31 ^d ± 0.53	0.39 ^c ± 0.12	0.10 ^c ± 0.09	1.12 ^a ± 0.63	0.06 ^a ± 0.01
24	0.98 ^c ± 0.05	0.55 ^b ± 0.06	0.13 ^{bc} ± 0.23	0.46 ^b ± 0.32	0.05 ^a ± 0.001
36	1.40 ^b ± 0.001	0.57 ^b ± 0.01	0.65 ^a ± 0.01	0.38 ^b ± 0.01	0.04 ^a ± 0.001
48	1.86 ^a ± 0.01	0.63 ^{ab} ± 0.02	0.26 ^{bc} ± 0.03	0.32 ^b ± 0.03	0.05 ^a ± 0.001
72	2.02 ^a ± 0.44	0.73 ^a ± 0.03	0.21 ^{bc} ± 0.09	0.17 ^b ± 0.05	0.05 ^a ± 0.001
96	2.07 ^a ± 0.22	0.62 ^{ab} ± 0.08	0.13 ^{bc} ± 0.13	0.10 ^b ± 0.05	0.02 ^b ± 0.03

หมายเหตุ : a, b, c, d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารสูตร GYCC ที่เสริมวิตามินและเกลือแร่แสดงดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.4 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 พบกรดแลคติก เท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร ต่อมาเมื่อมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นและมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างพบว่าปริมาณกรดแลคติกมากที่สุดเท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตร ไม่ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นคือ 0.31 กรัมต่อลิตร และพบว่าในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุดเท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณกรดอะซิติกได้ลดลงในช่วงเวลาที่ 96 เหลือเพียง 0.62 กรัมต่อลิตร

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลจะพบว่า ปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.32 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลได้ลดลงในชั่วโมงที่ 12 ได้ค่าคือ 0.10 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาต่อมาค่าจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเวลาที่ 36 ชั่วโมง ได้ค่าปริมาณเอทานอลมากที่สุด 0.65 กรัมต่อลิตร และลดลงจนถึงที่ชั่วโมงสุดท้าย ได้ปริมาณเอทานอล 0.13 กรัมต่อลิตร

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตนพบว่า เวลาเริ่มต้นจนพบปริมาณอะซิโตน 0.23 กรัมต่อลิตรและเพิ่มในชั่วโมงที่ 12 พบปริมาณอะซิโตนมีค่ามากที่สุดถึง 1.12 กรัมต่อลิตร ต่อมาปริมาณอะซิโตนได้ลดลงมากที่สุดในช่วงสุดท้ายที่ 96 เหลือ 0.10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณบิวทานอลคือ 0.06 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุดในช่วงที่ 12 มีปริมาณบิวทานอลคือ 0.06 กรัมต่อลิตรและลดลงกลับเพิ่มขึ้นในช่วงที่ 24, 36, 48, 72 และในช่วงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 96 พบว่ามีค่าลดลงมากที่สุดซึ่งมีค่าน้อยที่สุดคือ 0.02 กรัมต่อลิตร

เช่นเดียวกับกับ Li และคณะ (2014) ที่เลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สายพันธุ์ปกติด้วยอาหารที่ได้จากแป้งมันสำปะหลัง และเสริมด้วยอาหาร P2 ในขวดฝาเกลียด ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ที่ pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 80 ชั่วโมง เพื่อสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด และบิวทานอลได้ 20.11 ± 1.13 กรัมต่อลิตร และ 12.97 ± 0.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

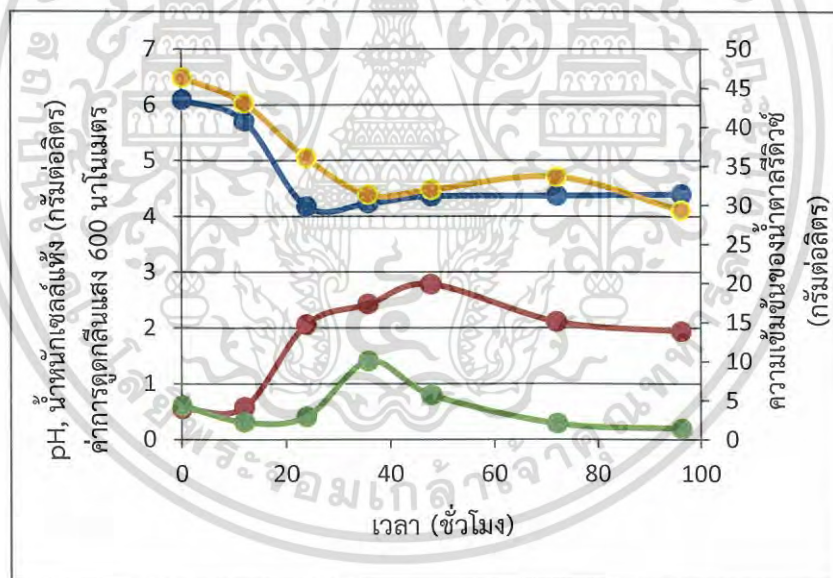
ในขณะที่ Gao และคณะ (2012) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในหลอดฝาเกลียว ในอาหาร P2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.5 โดยระหว่างการหมักไม่มีการปั่นกววน และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ให้ค่าผลได้ และค่าผลผลิต ABE เท่ากับ 0.30 กรัมต่อกรัม และ 0.22 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าเชื้อสามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.41 กรัมต่อลิตร

4.1.3 อาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส

เลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ด้วยอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส และเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ซึ่งแสดงดังในรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าค่าความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงในระหว่างชั่วโมงที่ 0, 12, 24 และ 36 คือ 46.33, 43.00 และ 36.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 คือ 29.33 กรัมต่อลิตร

ขณะที่น้ำหนักรวมแห้งในชั่วโมงแรกมีค่าเท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักรวมแห้งมีค่าลดลงและเพิ่มขึ้นอีกในชั่วโมงที่ 12 และ 24 คือ 0.33 และ 0.43 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 คือ 1.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 หลังจากนั้นลดลงจนมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของค่าการดูดกลืนแสงนั้น ในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.55 ต่อมาในชั่วโมงที่ 12 มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.57 และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 2.80 หลังจากนั้นค่อยๆมีค่าลดลงและต่ำสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 1.94 ที่ค่าความเป็นกรดต่างนั้นมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 6.14 จนมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 4.17 ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC โดยจากตารางที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ปริมาณกรดอะซิติกนั้นเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่ค่าพีเอชเริ่มลดลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อเจริญอยู่ในระยะการสร้างกรดอินทรีย์ หลังจากนั้นนั้นมีความเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในชั่วโมงที่ 36, 48, 72 และ 96 เท่ากับ 4.23, 4.36, 4.38 และ 4.40 ตามลำดับ



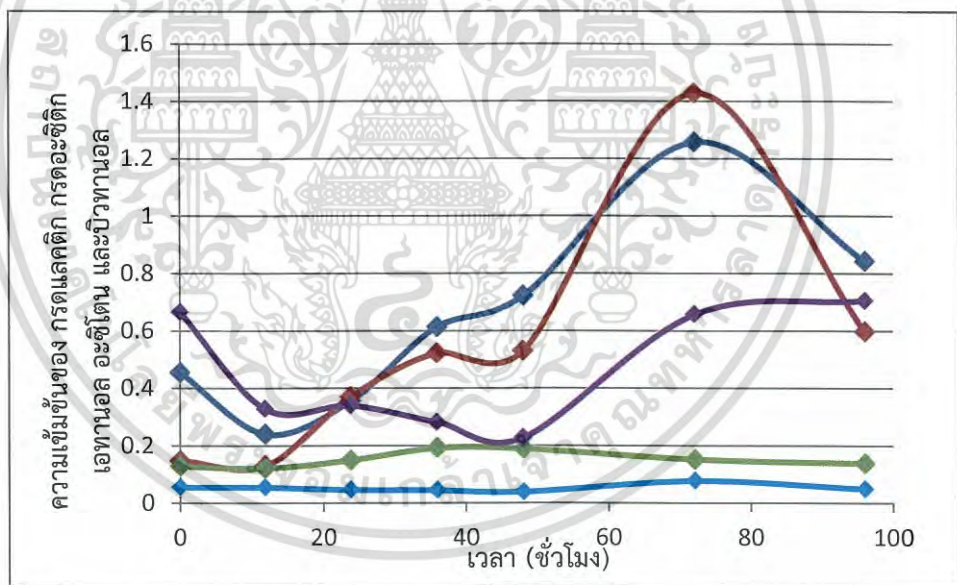
รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C (● ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด, ● ค่าความเป็นกรดต่าง, ● น้ำหนักรวมแห้ง, ● ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm	pH
0	0.57 ^b ± 0.21	46.33 ^a ± 1.20	0.55 ^e ± 0.00	6.57
12	0.33 ^b ± 0.30	43.00 ^b ± 1.00	0.57 ^e ± 0.00	6.14
24	0.43 ^b ± 0.23	36.00 ^c ± 1.00	2.06 ^c ± 0.01	4.95
36	1.40 ^a ± 0.46	31.33 ^{de} ± 1.52	2.43 ^b ± 0.02	4.7
48	0.33 ^b ± 0.20	32.00 ^d ± 1.73	2.80 ^a ± 0.02	4.56
72	0.33 ^b ± 0.12	33.67 ^d ± 0.58	2.12 ^c ± 0.15	4.59
96	0.23 ^b ± 0.23	29.33 ^e ± 1.53	1.94 ^d ± 0.50	4.59

หมายเหตุ a, b, c, d, e ในแถวแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเป็นกรดต่างไม่สามารถหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้



รูปที่ 4.6 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส (◆ กรดแลคติก, ◆ กรดอะซิติก, ◆ เอทานอล, ◆ อะซิโตน, ◆ บิวทานอล)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อGYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)				
	กรดแลคติก	กรดอะซิติก	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล
0	0.45 ^{cd} ±0.25	0.15 ^c ±0.08	0.13 ^{ab} ±0.02	0.66 ^a ±0.06	0.05 ^b ±0.001
12	0.24 ^d ±0.01	0.13 ^c ±0.003	0.12 ^b ±0.01	0.33 ^b ±0.02	0.05 ^b ±0.001
24	0.36 ^d ±0.03	0.37 ^{bc} ±0.02	0.15 ^{ab} ±0.003	0.34 ^b ±0.02	0.05 ^{bc} ±0.002
36	0.61 ^{bc} ±0.21	0.52 ^b ±0.03	0.19 ^a ±0.01	0.28 ^b ±0.02	0.05 ^{bc} ±0.003
48	0.72 ^b ±0.09	0.53 ^b ±0.05	0.19 ^a ±0.03	0.23 ^b ±0.02	0.04 ^c ±0.01
72	1.26 ^a ±0.10	1.43 ^a ±0.53	0.15 ^{ab} ±0.09	0.66 ^a ±0.28	0.08 ^a ±0.01
96	0.84 ^b ±0.03	0.60 ^b ±0.02	0.14 ^{ab} ±0.01	0.70 ^a ±0.05	0.05 ^{bc} ±0.002

หมายเหตุ : a, b, c, d ในแถวแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารสูตร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคสแสดงดังรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.6 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 พบกรดแลคติก เท่ากับ 0.45 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงต่อมาเกิดการลดลงของกรดแลคติกเป็นค่าที่น้อยที่สุดคือ 0.24 กรัมต่อลิตร ในเวลาต่อมาพบว่ามีแนวโน้มที่มีกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 72 พบว่ามีกรดแลคติกสูงสุดคือ 1.26 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างพบว่ามีปริมาณกรดแลคติกลดลงเพียงเล็กน้อย

ในส่วนของภาวะวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นคือ 0.15 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงต่อมาพบปริมาณกรดอะซิติกที่น้อยที่สุด คือ 0.13 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 48 ในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุดเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตร

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลจะพบว่า ปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลได้ลดลงในชั่วโมงที่ 12 ได้ค่าน้อยที่สุดคือ 0.12 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาต่อมาค่าจะเริ่มเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเวลาที่ 36 ชั่วโมง ได้ค่าปริมาณเอทานอลมากที่สุด 0.19 กรัมต่อลิตร และค่อยๆลดลงจนถึงที่ชั่วโมงสุดท้าย ได้ปริมาณเอทานอล 0.14 กรัมต่อลิตร

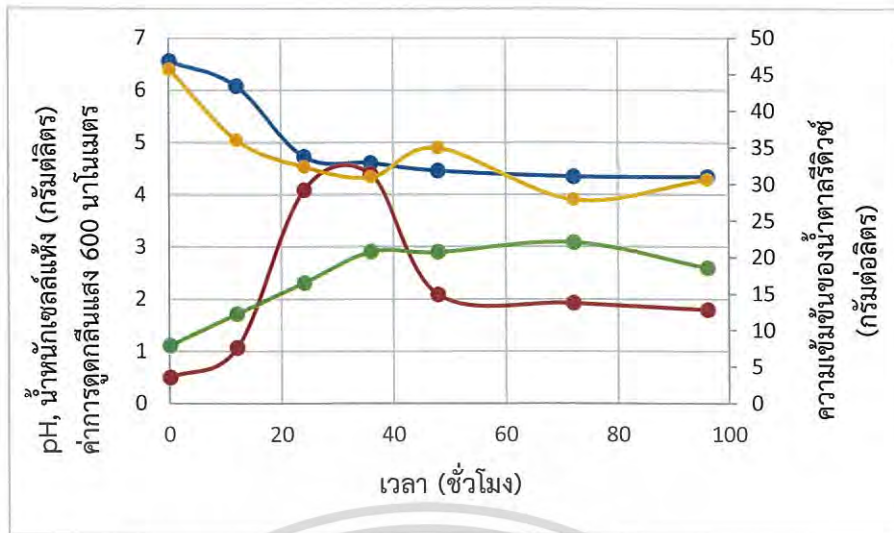
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตนพบว่า เวลาเริ่มต้นจนพบปริมาณอะซิโตน 0.66 กรัมต่อลิตรและมีแนวโน้มที่ลดลงจนถึงชั่วโมงที่เพิ่มในชั่วโมง 48 พบปริมาณอะซิโตนน้อยที่สุดคือ 0.23 กรัมต่อลิตร ต่อมาปริมาณอะซิโตนได้เพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงสุดท้ายที่ 96 พบปริมาณอะซิโตนคือ 0.70 กรัมต่อลิตร

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณบิวทานอลคือ 0.05 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณบิวทานอลน้อยที่สุดคือ 0.04 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72 พบปริมาณบิวทานอลคือ 0.08 กรัมต่อลิตร และในชั่วโมงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 96 พบว่ามีค่าลดลงคือ 0.05 กรัมต่อลิตร

เช่นเดียวกับ Wang และ Chen (2011) พบว่าการหมักโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารที่ใช้น้ำตาลจากการปรับสภาพ และย่อยซังข้าวโพดด้วย เอนไซม์ ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตรอาหาร 30 มิลลิลิตร ค่า pH เริ่มต้น 6.5 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เริ่มต้นที่ 53.52 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าเชื้อสร้างสารผลิตภัณฑ์ความเข้มข้น 3.71 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน:บิวทานอล:เอทานอล=1:0.31:1.91)

4.1.4 อาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.7 พบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 0, 12, 24 และ 36 เท่ากับ 45.67, 36.00, 32.33 และ 31.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จนเวลาผ่านไปชั่วโมงที่ 96 พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ 30.67 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างก็ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเดียวกันโดยมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.55 ต่อมาลดลงเท่ากับ 6.07 ในชั่วโมงที่ 12 และมีค่าลดลงอย่างมากในชั่วโมงที่ 24 คือ 4.72 เนื่องจากเชื้อมีการสร้างกรดอินทรีย์ ต่อจากนั้นพีเอชมีค่าความเป็นกรดต่างลดลงเรื่อยๆ จนถึงในช่วงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ (96 ชั่วโมง) มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.35 ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่เชื้อมีการเจริญเติบโตมากสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 72 คือ 3.17 กรัมต่อลิตรจากที่เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงและเพิ่มในชั่วโมงที่ 12 และ 24 เท่ากับ 0.70 และ 2.30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และลดลงเหลือ 2.67 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ชั่วโมงแรกของการเก็บตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.50 และมีค่าเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 1.60 จนชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.10 ของการเก็บตัวอย่าง และลดลงเรื่อยๆ เท่ากับ 1.80 ในชั่วโมงที่ 96 ชั่วโมงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง



รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 และบ่มในถังหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนที่ 37°C (● ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด, ● ค่าความเป็นกรดต่าง, ● น้ำหนักเซลล์แห้ง, ● ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร)

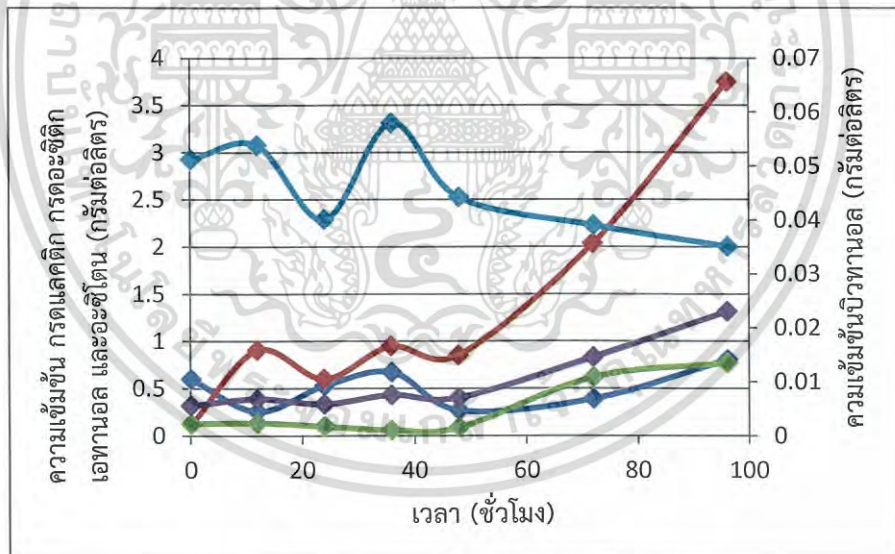
ผลของการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารสูตร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่แสดงดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.8 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 พบกรดแลคติก เท่ากับ 0.59 กรัมต่อลิตร กรดแลคติกลดลงน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 12 มีค่าเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 24, 36 จากนั้นลดลงอีกครั้งในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นมีการสร้างกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและมากที่สุดในชั่วโมงสุดท้ายมีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุดเท่ากับ 0.81 กรัมต่อลิตร

ในส่วนของการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นที่น้อยที่สุดคือ 0.12 กรัมต่อลิตร ต่อมาีค่าของกรดอะซิติกที่ลดลงและเพิ่มขึ้นสลับกันไปในชั่วโมงที่ 12, 24 และ 36 เท่ากับ 0.90, 0.60 และ 0.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับจนถึงโมงที่ 72 คือ 2.04 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีค่าสูงสุดคือ 3.75 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.7 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm	pH
0	1.10 ^b ± 0.26	45.67 ^a ± 0.58	0.50 ^d ± 0.00	6.55
12	0.70 ^b ± 0.20	36.00 ^b ± 1.00	1.60 ^c ± 0.95	6.07
24	2.30 ^a ± 0.80	32.33 ^c ± 2.10	4.10 ^c ± 0.10	4.72
36	2.90 ^a ± 0.53	31.00 ^c ± 1.00	3.40 ^b ± 0.02	4.60
48	2.90 ^a ± 0.30	35.00 ^b ± 1.00	2.10 ^c ± 0.42	4.46
72	3.17 ^a ± 0.32	28.00 ^d ± 1.00	1.94 ^c ± 0.44	4.36
96	2.67 ^a ± 1.20	30.67 ^c ± 2.10	1.80 ^c ± 0.50	4.35

หมายเหตุ a, b, c, d, e, d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเป็นกรดต่างไม่สามารถหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้



รูปที่ 4.8 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่ (◆ กรดแลคติก, ◆ กรดอะซิติก, ◆ เอทานอล, ◆ อะซิโตน, ◆ บิวทานอล)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลจะพบว่า ปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร และปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตร และลดลงอีกในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาต่อมาค่าจะเริ่มลดลงจนกระทั่งเวลาที่ 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ค่าปริมาณเอทานอลน้อยที่สุดคือ 0.06 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 พบว่าที่ ชั่วโมงสุดท้ายปริมาณเอทานอลได้ค่าที่สูงที่สุดคือ 0.77 กรัมต่อลิตร

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตนพบว่า เวลาเริ่มต้นพบปริมาณอะซิโตนน้อยที่สุดคือ 0.32 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันในชั่วโมงที่ 12, 24, 36 และ 48 เท่ากับ 0.38, 0.33, 0.43, 0.41 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในระยะต่อมาพบปริมาณอะซิโตนที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่ามากสุดในชั่วโมงสุดท้ายได้ค่าที่สูงที่สุดคือถึง 1.32 กรัมต่อลิตร

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอล พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณบิวทานอลคือ 0.05 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร และลดลงในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าของบิวทานอลเพิ่มสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีค่าคือ 0.06 กรัมต่อลิตรในเวลาต่อมาค่าบิวทานอลมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายพบปริมาณบิวทานอลลดลงเหลือน้อยที่สุดคือ 0.04 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณสารผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)				
	กรดแลคติก	กรดอะซิติก	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล
0	0.59 ^a ±0.87	0.12 ^c ±0.01	0.12 ^c ±0.004	0.32 ^e ±0.02	0.05 ^b ±0.002
12	0.25 ^a ±0.01	0.90 ^c ±1.20	0.13 ^c ±0.01	0.38 ^{cd} ±0.02	0.05 ^{ab} ±0.003
24	0.53 ^a ±0.02	0.60 ^c ±0.02	0.10 ^{bc} ±0.01	0.33 ^{de} ±0.03	0.04 ^d ±0.001
36	0.67 ^a ±0.02	0.95 ^c ±0.04	0.06 ^d ±0.07	0.43 ^c ±0.03	0.06 ^a ±0.001
48	0.27 ^a ±0.02	0.86 ^c ±0.65	0.09 ^{cd} ±0.002	0.41 ^c ±0.02	0.04 ^c ±0.003
72	0.40 ^a ±0.02	2.04 ^b ±0.14	0.63 ^b ±0.03	0.84 ^b ±0.06	0.04 ^{de} ±0.002
96	0.81 ^a ±0.05	3.75 ^a ±0.26	0.77 ^a ±0.03	1.32 ^a ±0.38	0.04 ^e ±0.002

หมายเหตุ : a, b, c, d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คล้ายกับงานวิจัยของ Qureshi และคณะ (2014) ทำการเปรียบเทียบผลผลิตจากการหมักโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 ในอาหาร P2 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยมีชุดควบคุมแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส บ่มในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1.25 ลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมดได้ 55.7 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลได้ และผลผลิตเป็น 0.42 และ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้จากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยซังข้าวโพดมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสร้างสารผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 50.14 กรัมต่อลิตร และให้ค่าผลได้ และผลผลิตเท่ากับ 0.43 และ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ซึ่งจากงานวิจัยของ Gao และคณะ (2012) เช่นเดียวกันที่ทดลองใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 ที่กลายพันธุ์ เลี้ยงในขวดฝาเกลียวปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารที่ใช้ซังข้าวโพดที่ได้จากการปรับสภาพด้วยเบส และย่อยด้วยเอนไซม์แทนน้ำตาล และมีการเสริมด้วยอาหาร P2 ใช้เป็น pH เริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไร้ออกซิเจน โดยไม่มีการเขย่า หรือปั่นกวน พบว่าเชื้อให้ค่าผลได้สาร ABE และค่าผลผลิต ABE เท่ากับ 0.41 และ 0.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (อะซิโตน 4.34 กรัมต่อลิตร, เอทานอล 1.24 กรัมต่อลิตร, บิวทานอล 9.84 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำตาลผสมเป็นแหล่งคาร์บอน และเสริมด้วยอาหาร P2 ให้ค่าผลได้ ABE และค่าผลผลิต ABE 0.33 และ 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

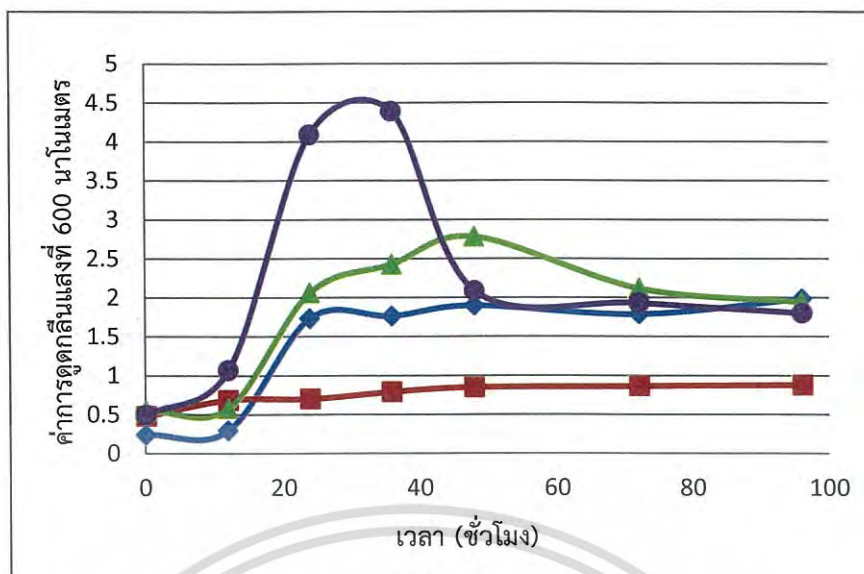
และงานวิจัยของ Qureshi และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ และการย่อยฟางข้าวบาร์เลย์ และเสริมด้วยอาหาร P2 บ่มเชื้อในขวดฝาเกลียว ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร pH เริ่มต้นที่ 6.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าเชื้อผลิตบิวทานอลได้ 4.0 กรัมต่อลิตร และสารผลิตภัณฑ์ ABE 7.09 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักแบบกะ

4.2 ผลของวิตามิน และเกลือแร่ และการใช้ซังข้าวโพดจากการปรับสภาพแทนกลูโคส ต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

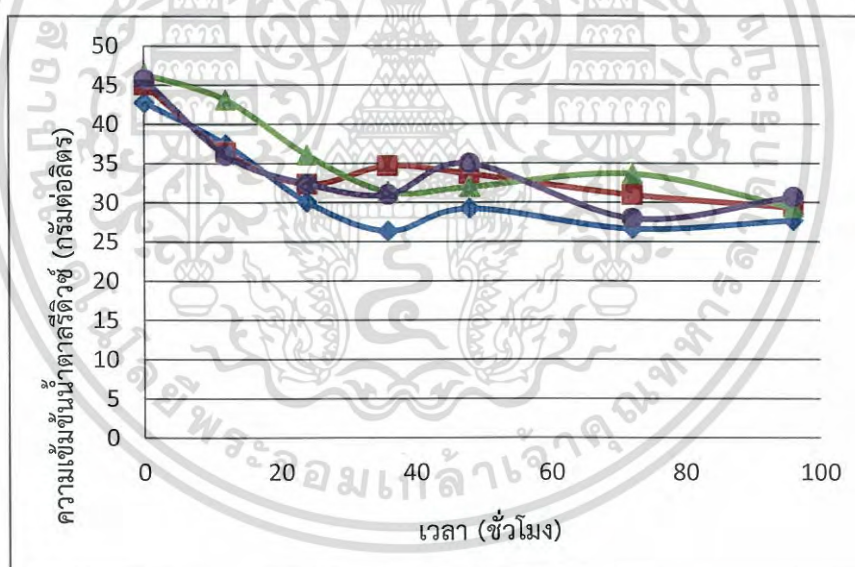
จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติตารางที่ 4.9 เพื่อหาค่าปริมาณของอะซิโตน พบว่าอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่ในชั่วโมงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง ให้ปริมาณอะซิโตนสูงที่สุดเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญกับปริมาณอะซิโตนที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเกลือแร่ (1.12 กรัมต่อลิตร) สำหรับปริมาณอะซิโตนที่ต่ำที่สุดนั้นได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC

ในส่วนของปริมาณบิวทานอลที่สูงที่สุดในอาหาร GYCC แต่ละชนิดได้กราฟดังรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสให้ปริมาณบิวทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร และอาหาร GYCC ให้ปริมาณบิวทานอลต่ำที่สุด ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญกับอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเกลือแร่ และอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่ ให้ค่าเท่ากับ 0.05, 0.06 และ 0.06 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ในแต่ละช่วงเวลา (◆ GYCC, ■ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน, ▲ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส, ● GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่)

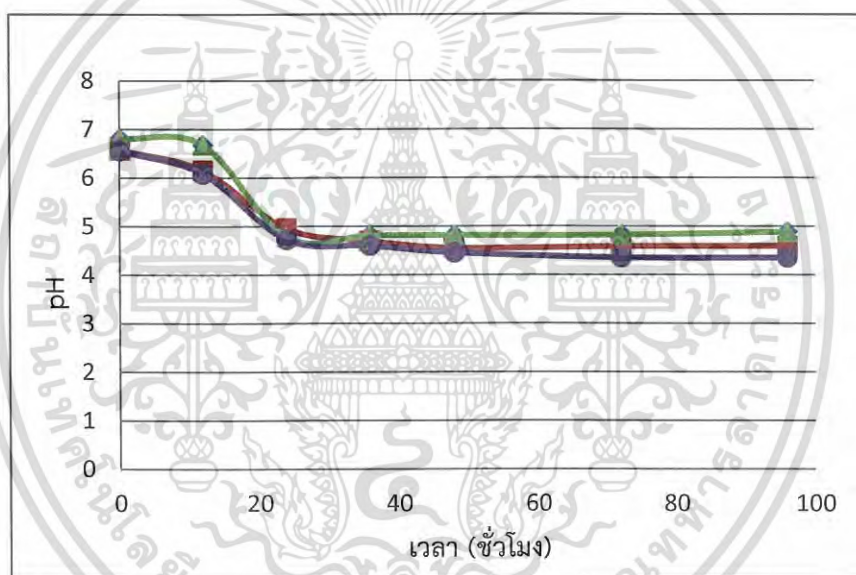


รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละช่วงเวลา (◆ GYCC, ■ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน, ▲ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส, ● GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

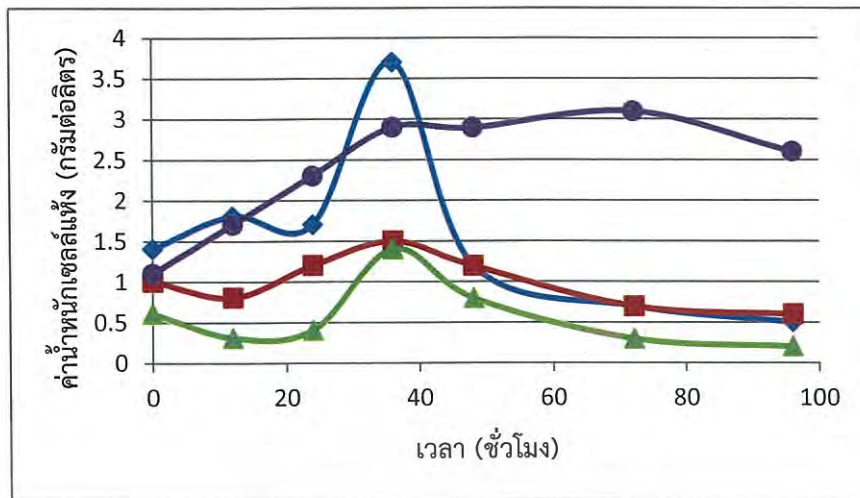
จากรูปที่ 4.10 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในแต่ละช่วงเวลาในอาหารต่างชนิดกัน พบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยจะเห็นว่าเชื้อใช้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในระหว่าง 0 ถึง 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเห็นว่าเส้นกราฟเริ่มมีแนวโน้มคงที่ เนื่องจากเชื้อมีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง

รูปที่ 4.11 แสดงค่าความเป็นกรดต่างในแต่ละช่วงเวลา จะเห็นว่าค่าความเป็นกรดต่างในอาหารแต่ละชนิดเป็นไปในแนวโน้มเดียวกัน โดยมีค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นที่ประมาณ 6.8 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากเชื้ออยู่ในระยะสร้างกรด (acidogenesis) หลังจากชั่วโมงที่ 24 ค่าความเป็นกรดต่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อนำกรดที่สร้างได้มาสร้างสารผลิตภัณฑ์ (solventogenesis)



รูปที่ 4.11 ค่าความเป็นกรดต่างในแต่ละช่วงเวลา (◆ GYCC, ■ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน, ▲ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส, ● GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่)

รูปที่ 4.12 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อในแต่ละช่วงเวลา พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตสูงสุดระหว่างชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยพบว่าในอาหาร GYCC หลักในชั่วโมงที่ 36 เชื้อมีการเจริญสูงสุด



รูปที่ 4.12 คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งในแต่ละช่วงเวลา (♦ GYCC, ■ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน, ▲ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส, ● GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคส วิตามิน และเกลือแร่)

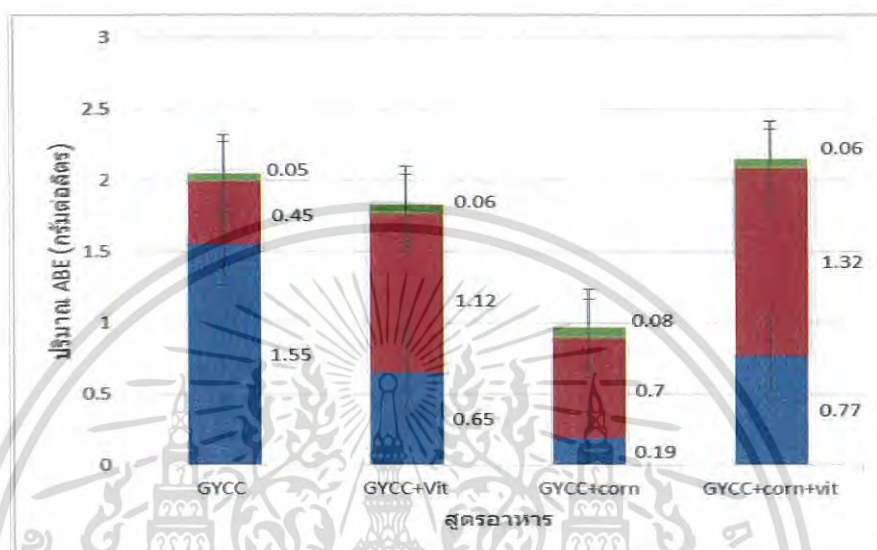
ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ชนิดต่างๆที่ใช้ในการศึกษา

อาหารเลี้ยงเชื้อ	กรดแลคติก	กรดอะซิติก	เอทานอล	อะซิโตน	บิวทานอล
GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	1.23 ^b ±0.03	0.58 ^c ±0.31	1.55 ^a ±0.04	0.45 ^b ±0.01	0.05 ^b ±0.00
GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเกลือแร่	2.07 ^a ±0.22	0.73 ^c ±0.03	0.65 ^c ±0.01	1.12 ^a ±0.63	0.06 ^b ±0.01
GYCC ที่ใช้ซึ่งข้าวโพดแทนน้ำตาลกลูโคส	1.26 ^b ±0.10	1.43 ^b ±0.53	0.19 ^d ±0.01	0.70 ^{ab} ±0.05	0.08 ^a ±0.01
GYCC ที่ใช้ซึ่งข้าวโพดแทนกลูโคสเสริมวิตามิน	0.81 ^c ±0.49	3.75 ^a ±0.26	0.77 ^b ±0.03	1.32 ^a ±0.04	0.06 ^b ±0.00

หมายเหตุ a, b, c และ d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของปริมาณเอทานอล พบว่าอาหารอาหาร GYCC ให้ปริมาณเอทานอลที่มากที่สุดเท่ากับ 3.15 กรัมต่อลิตร และอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสให้ปริมาณเอทานอลที่น้อยที่สุดคือ 0.19 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหาร GYCC ที่เสริมวิตามิน และอาหารที่เสริมซังข้าวโพดและวิตามินมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 0.65 และ 0.77 กรัมต่อลิตรตามลำดับ



รูปที่ 4.13 ปริมาณอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ที่สูงที่สุดในอาหาร GYCC แต่ละชนิด (■ อะซีโตน, ■ บิวทานอล และ ■ เอทานอล)

จากตารางที่ 4.10 จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อที่ผลิตสารผลิตภัณฑ์ ABE ได้ค่าผลผลิตบิวทานอลเป็น 0.0005 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ ABE รวม, ค่าผลได้บิวทานอลเป็น 0.16 และ 0.002 ตามลำดับ อาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน ได้ค่าผลผลิตบิวทานอลเป็น 0.005 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ ABE รวม, ค่าผลได้บิวทานอลเป็น 0.13 และ 0.004 ตามลำดับ ส่วนอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสดังตารางที่ 4.10 ได้ค่าผลผลิตบิวทานอลเป็น 0.001 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ ABE รวม, ค่าผลได้บิวทานอลเป็น 0.06 และ 0.005 ตามลำดับ และอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสและวิตามิน ได้ค่าผลผลิตบิวทานอลเป็น 0.005 กรัมต่อลิตร และได้ค่าผลได้ ABE รวม, ค่าผลได้บิวทานอลเป็น 0.11 และ 0.003 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.10 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ด้วยอาหาร GYCC แบบต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ABE รวม	บิวทานอลที่ ชั่วโมงสูงสุด	เวลาที่บิวทานอลสูงสุด	ปริมาณน้ำตาล ที่ใช้ไป	ค่าผลได้ ของ ABE	ค่าผลได้ของบิวทานอล	ค่าผลผลิตบิวทานอล
GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน	2.05	0.05	96	23.33	0.09	0.002	0.001
GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และ เกลือแร่	1.83	0.06	12	13.67	0.13	0.004	0.005
GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดแทน น้ำตาลกลูโคส	0.98	0.08	72	16.33	0.06	0.005	0.001
GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดแทน น้ำตาลกลูโคสเสริมวิตามิน	2.15	0.06	36	19	0.11	0.003	0.002

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

เพื่อศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 และศึกษาการสร้างสารผลิตภัณฑ์ต่างๆโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC เสริมด้วยวิตามินและเกลือแร่, GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส และ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสและวิตามิน โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC เป็นชุดควบคุม ทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในสภาวะไร้ออกซิเจน ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาผลของวิตามิน พบว่าอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสและวิตามินทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมากที่สุดซึ่งมีค่าความขุ่นเท่ากับ 4.10 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และเมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพบว่าชุดควบคุมให้ปริมาณเอทานอลมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.1477 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหาร GYCC ที่เสริมด้วยวิตามินมีปริมาณบิวทานอลและแลคติกสูงสุดเท่ากับ 0.0609 และ 2.0737 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสวิตามินมีปริมาณ อะซีโตน และ อะซิติกที่มากที่สุดเท่ากับ 1.3176 และ 3.7499 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลของการศึกษาซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสและวิตามินทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตมากที่สุดซึ่งมีค่าความขุ่นเท่ากับ 4.10 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส และเมื่อนำมาวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง HPLC อาหารชุดควบคุมพบปริมาณแลคติกและบิวทานอลมากที่สุด เท่ากับ 1.30 และ 3.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสมีปริมาณบิวทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร และอาหาร GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคสและวิตามินมีปริมาณ อะซีโตนและกรดอะซิติกที่มากที่สุดเท่ากับ 1.32 และ 3.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองครั้งต่อไปควรทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์อื่นเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ทำให้ได้ปริมาณสารผลิตภัณฑ์น้อย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤตกา อินทรสุวรรณ, นัฏฐจี หมื่นพราน, และ บุศบงษ์ พลเยี่ยม. (2553). การผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*. โครงการพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร.

ไกรภพ ภาสกริมย์. (2553). การหมุนเวียนวัสดุเหลือใช้เพื่อการประหยัดสิ่งแวดล้อม กรณีศึกษาการเปรียบเทียบกระถางเพาะชำที่ผลิตจากขังข้าวโพดกับวัสดุเหลือใช้อื่น. วิทยานิพนธ์ครุศาสตร์อุตสาหกรรมมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมพูนุช วิรุณานนท์, และ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล. (2555). ไปโอชีวทานอลเชื้อเพลิงเหลวที่จะมาแทนเอทานอล. วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ 22(3), 703-709.

ชลติยา ฮิสเฮาะ, ชิดชนก ฤทธิคำรพ, และ นาวิ หล้าดี. (2555). การศึกษาแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อการเจริญของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461. โครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เต็ม สมิตินันท์. (ม.ป.ป.). โครงการเผยแพร่ข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นบนพื้นที่สูง. ใน สถาบันวิจัยและพัฒนาที่สูง (องค์การมหาชน), ข้อมูลของข้าวโพด อ้างอิงใน: หนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.

ทวีศักดิ์ ภูหล้า. (2540). หน่วยที่ 6 การจัดการการผลิตข้าวโพด. ใน สมิตรา โภชนา, และ สมพิศ นิชลานนท์, การจัดการการผลิตธัญพืช และพืชอาหารสัตว์ (หน้า 529-626). สาขาวิชาการส่งเสริมเกษตรและสหกรณ์.

นัย บำรุงเวช. (1 พฤศจิกายน 2555). เทคโนโลยี ก้าวหน้า. มติชนรายวัน, หน้า 74.

บุษยมาศ เหมณี. (2554). กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. (2545). การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญา

เอกสารนี้เป็นเอกสารมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์. (2539). หลักการอาหารสัตว์ หลักโภชนาศาสตร์และการประยุกต์. เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิเชษฐ กระจุดลอยมา สุรพงษ์ ประสิทธิ์วัฒนเสวี. (18 พฤศจิกายน 2558). ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์. [ออนไลน์]. <http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/ftorn.html>.

มณฑนา กอประเสริฐกุล, สิริรัตน์ เหล่าศิริพัฒน์, และ สุรีย์ พัทธมพงศ์วัฒน์. (2555). การศึกษาแหล่งน้ำตาราคากากเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1416. โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุขใจ ชูจันทร์. (2554). การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรีพร เกตุงาม. (16 ธันวาคม 2558). เอกสารประกอบการสอนวิชาธัญพืช. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก <http://www.doae.go.th/plant/corn.htm>.

D.T., Woods, D.R Jones. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50(4), 484-524.

H.G. Li, W. Luo, Q. Wang, และ X.B. Yu. (2014). Direct fermentation of gelatinized cassava starch to acetone, butanol, and ethanol using *Clostridium acetobutylicum* mutant obtained by atmospheric and room temperature plasma. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172 (7), 3330-3341.

H.R. Badr, R. Toledo, และ M.K. Hamdy. (2001). continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*, 119-132.

Kai Gao, Yun Li, Shen Tian, และ Xiushan Yang. (2012). Screening and characteristics of a butanol-tolerant strain and butanol production from enzymatic hydrolysate. *World J Microbiol Biotechnol* (2012) 28, 2963-2971.

Kheyrandish, M., Asadollahi, M, A., Jeihanipour, A., Doostmohammadi, M., Rismani, H., Karimi, และคนอื่นๆ. (2013). Direct production of acetone-butanol-ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Fuel*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 129-133. ไม่สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- L. Wang, และ H.Z. Chen. (2011). Increased fermentability of enzymatically hydrolyzed stream-exploded corn stover for butanol production by removal of fermentation inhibitors. *Process Biochem* 46 , 604-607.
- L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P., Xu, Z., Jiang. (2009). Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour. Technol*, 100 (13), 3403–3409.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., และ Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia . *Biotechnology and Bioengineering*, 101: 209-228.
- Lijuan, M., Youzhi, C., Rui ,C., Xueqiang, L., Cuiying, Z., และ Dongguang, X. (2015). Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corncob. *Bioresource Technology*, 180 : 1- 6.
- N. Quresh, B.C. Saha, B. Dien, R.E. Hector, และ M.A. Cotta. (2010). Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate. *Biomass and Bioenergy* 34, 559-565.
- N. Qureshi, M.A. Cotta, และ B.C. Sasha. (2014). Bioconversion of barley straw and corn stover to butanol (a biofuel) in integrated fermentation and simultaneous product recovery bioreactors. *Food and Bioproducts Processing*, 298-308.
- P Durre. (2008). Fermentative butanol production. *Annals of the New York* , 1125: 353-362.
- R.Kai, G. and Lars. (2014). ABE fermentation from enzymatic hydrolysate of NaOH pretreated corncobs. *Biomass and Bioenergy*, 66 : 110 -115.
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y., Zhang, R., Jenkins, B. M., และคนอื่นๆ. (2013). Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy* , 105 : 1-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

ข้อมูลกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ทำการเตรียมสารละลาย (Stock) 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 200 $\mu\text{g/ml}$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1000 \mu\text{g/ml} (v_1) = (200 \mu\text{g/ml})(10\text{ml})$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 200 $\mu\text{g/ml}$ จะต้องใช้กลูโคส 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 2 ml

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 400 $\mu\text{g/ml}$ จะต้องใช้กลูโคส 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 4 ml

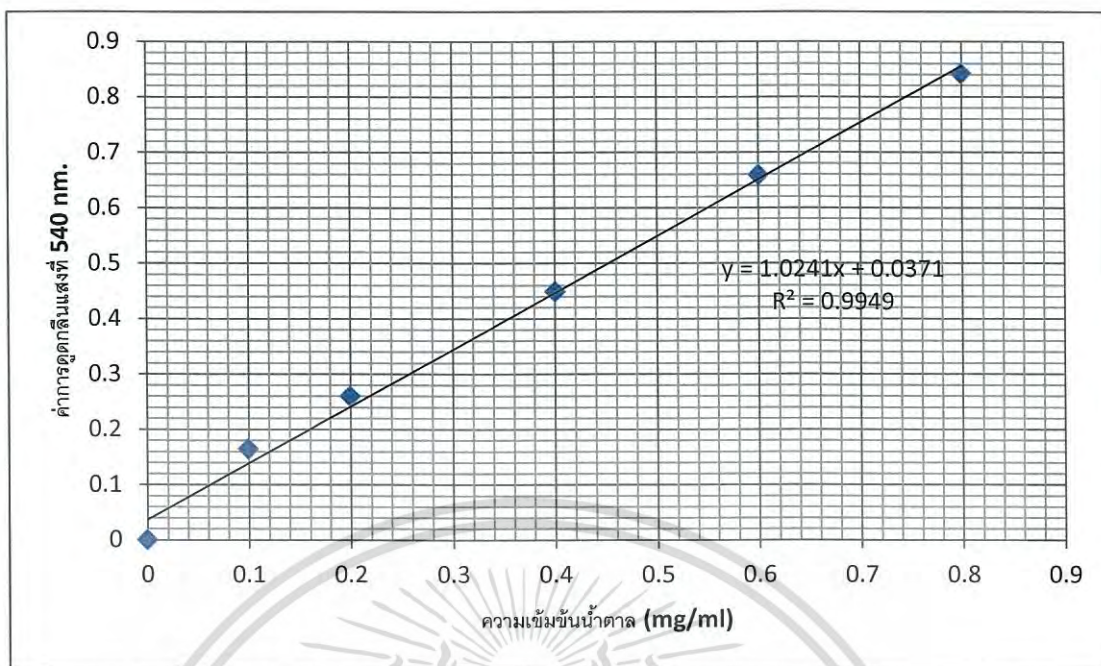
สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 600 $\mu\text{g/ml}$ จะต้องใช้กลูโคส 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 6 ml

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 800 $\mu\text{g/ml}$ จะต้องใช้กลูโคส 1000 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 8 ml

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method)

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0	0.000
100	0.164
200	0.259
400	0.448
600	0.660
800	0.842

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

ข้อมูลกราฟมาตรฐานสารอินทรีย์

การเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดอะซิติกคือ 99.8% มวลโมเลกุล 60.05 และความหนาแน่น 1.05 ที่ 25°C

คำนวณความเข้มข้นกรดอะซิติกจากสูตร

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 1.05 \times 99.8}{60.05} = 17.45 \text{ mol}$$

เตรียมสารละลาย 1.0 M กรดอะซิติกปริมาตร 50 ml คำนวณจากสูตร

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (17.45 \text{ mol})(V_1) &= (1.0 \text{ mol})(50 \text{ ml}) \\ V_1 &= \frac{2.86 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 2.86 \text{ ml} \end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 0.2 mol/L

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (17.45 \text{ mol})(V_1) &= (0.2 \text{ mol})(10 \text{ ml}) \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$V_1 = \frac{2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 2 \text{ ml}$$

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 0.2 mol/L จะต้องใช้กรดอะซิติก 1.0 mol ปริมาตร 2 ml

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 0.4 mol/L จะต้องใช้กรดอะซิติก 1.0 mol ปริมาตร 4 ml

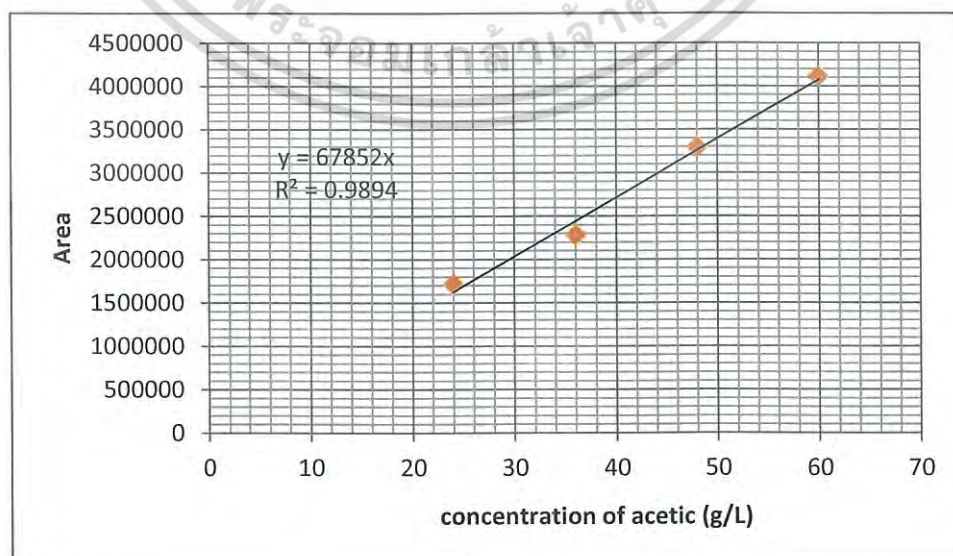
สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 0.6 mol/L จะต้องใช้กรดอะซิติก 1.0 mol ปริมาตร 6 ml

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 0.8 mol/L จะต้องใช้กรดอะซิติก 1.0 mol ปริมาตร 8 ml

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 1.0 mol/L จะต้องใช้กรดอะซิติก 1.0 mol ปริมาตร 10 ml

ตารางที่ ก.2 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.0	0.0	0
0.2	12.01	844719
0.4	24.02	1708809
0.6	36.03	2280096
0.8	48.04	3298995
1.0	60.05	4110179



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดอะซิติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายกรดแลคติกมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดแลคติก คือ 85% มวลโมเลกุล 90.08 และความหนาแน่น 1.27 ที่ 25°C

คำนวณความเข้มข้นกรดแลคติกจากสูตร

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 1.27 \times 85}{90.08} = 11.983 \text{ mol}$$

เตรียมสารละลาย 1.0 M กรดแลคติก ปริมาตร 50 ml คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(11.98 \text{ mol})(V_1) = (1.0 \text{ mol})(50 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml}}{11.98 \text{ mol}} = 4.17 \text{ ml}$$

การเตรียมสารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 0.2 mol/L

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = \frac{2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 2 \text{ ml}$$

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน 0.2 mol/L จะต้องใช้กรดแลคติก 1.0 mol ปริมาตร 2 ml

สารละลายกรดแลคติกมาตรฐาน 0.4 mol/L จะต้องใช้กรดแลคติก 1.0 mol ปริมาตร 4 ml

สารละลายกรดแลคติกมาตรฐาน 0.6 mol/L จะต้องใช้กรดแลคติก 1.0 mol ปริมาตร 6 ml

สารละลายกรดแลคติกมาตรฐาน 0.8 mol/L จะต้องใช้กรดแลคติก 1.0 mol ปริมาตร 8 ml

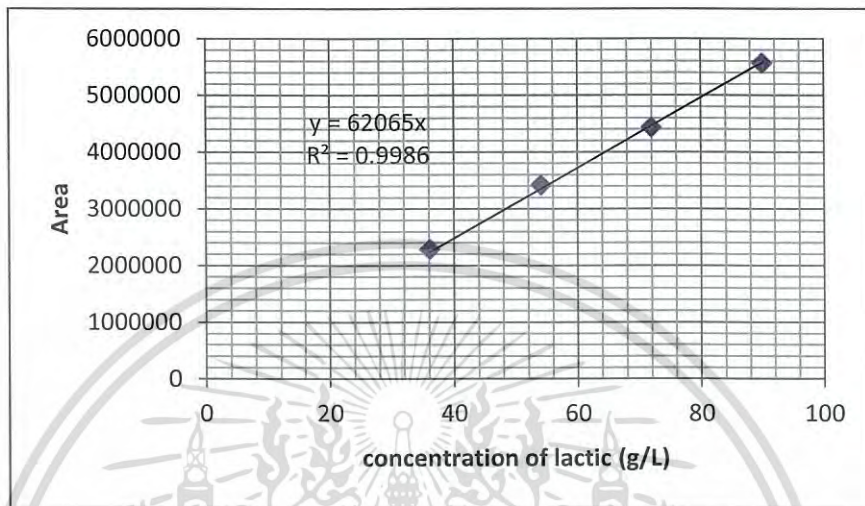
สารละลายกรดแลคติกมาตรฐาน 1.0 mol/L จะต้องใช้กรดแลคติก 1.0 mol ปริมาตร 10 ml

ตารางที่ ก.3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.0	0.0	0
0.2	18.016	1271877
0.4	36.032	2286198

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา 36.032 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ 2286198 การนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.6	54.048	3416556
0.8	72.064	4437223
1.0	90.08	5561957



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลคติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้นเอทานอล คือ 99.5% มวลโมเลกุล 46.08 และความหนาแน่น 0.789 ที่ 25°C

คำนวณความเข้มข้นเอทานอล จากสูตร

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.789 \times 99.5}{46.08} = 17.04 \text{ mol}$$

เตรียมสารละลาย 1.0 M เอทานอล ปริมาตร 100 ml คำนวณจากสูตร

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ (17.04 \text{ mol})(V_1) &= (1.0 \text{ mol})(100 \text{ ml}) \\ V_1 &= \frac{5.87 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 5.87 \text{ ml} \end{aligned}$$

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 0.2 mol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(1.0 \text{ mol})(V_1) = (0.2 \text{ mol})(25 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 5 \text{ ml}$$

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.2 mol/L จะต้องใช้เอทานอล 1.0 mol ปริมาตร 5 ml

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.4 mol/L จะต้องใช้เอทานอล 1.0 mol ปริมาตร 10.0 ml

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.6 mol/L จะต้องใช้เอทานอล 1.0 mol ปริมาตร 15.0 ml

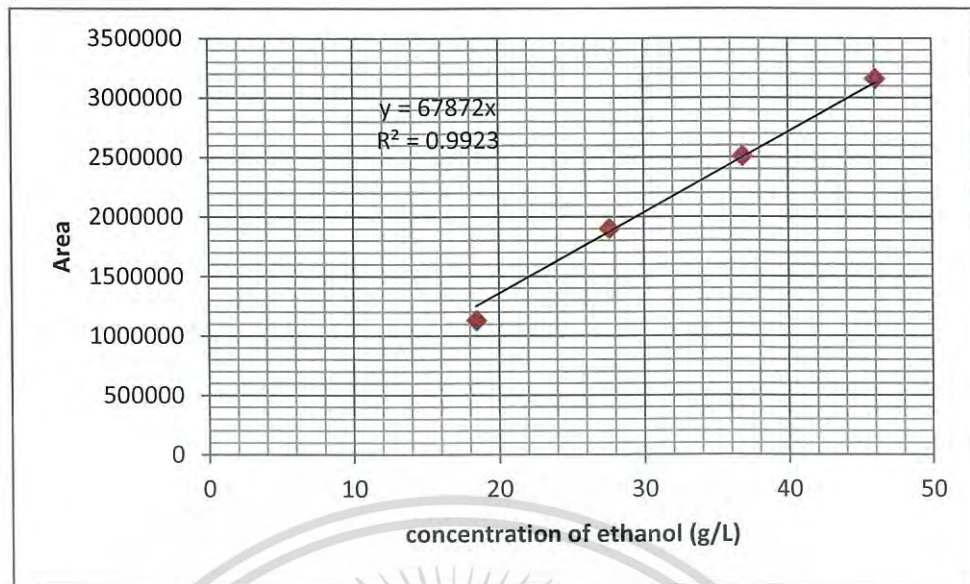
สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.8 mol/L จะต้องใช้เอทานอล 1.0 mol ปริมาตร 20.0 ml

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 1.0 mol/L จะต้องใช้เอทานอล 1.0 mol ปริมาตร 25.0 ml

ตารางที่ ก.4 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.0	0.00	0
0.2	9.213	578828
0.4	18.427	1124964
0.6	27.640	1898109
0.8	36.854	2510758
1.0	46.068	3156226

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

ความเข้มข้นอะซิโตน คือ 99.98% มวลโมเลกุล 58.08 และความหนาแน่น 0.791 ที่ 25°C

คำนวณความเข้มข้นอะซิโตน จากสูตร

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.791 \times 99.98}{58.08} = 13.62 \text{ mol}$$

เตรียมสารละลาย 1.0 M อะซิโตน ปริมาตร 100 ml คำนวณจากสูตร

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(13.26 \text{ mol})(V_1) = (1.0 \text{ mol})(100 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ml}}{13.26} = 7.34 \text{ ml}$$

การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 0.2 mol

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

$$V_1 = \frac{2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 2 \text{ ml}$$

สารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.2 mol/L จะต้องใช้อะซิโตน 1.0 mol ปริมาตร 2 ml

สารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.4 mol/L จะต้องใช้อะซิโตน 1.0 mol ปริมาตร 4 ml

สารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.6 mol/L จะต้องใช้อะซิโตน 1.0 mol ปริมาตร 6 ml

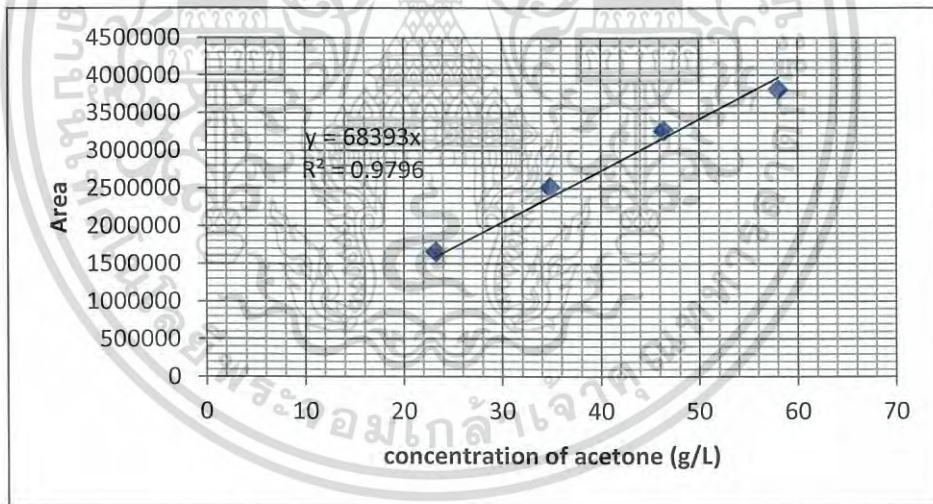
เอกสารนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 1.0 mol/L จะต้องใช้อะซิโตน 1.0 mol ปริมาตร 10 ml

ตารางที่ ก.5 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายอะซิโตนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.0	0.00	0
0.2	11.616	1497454
0.4	23.232	1659627
0.6	34.848	2504753
0.8	46.464	3257784
1.0	58.08	3807143



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายอะซิโตน ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

ความเข้มข้นบิวทานอล คือ 99.98% มวลโมเลกุล 74.12 และความหนาแน่น 0.791 ที่ 25°C

คำนวณความเข้มข้นบิวทานอล จากสูตร

$$C = \frac{10 \times \text{ความหนาแน่น} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น}}{\text{มวลโมเลกุล}} = \frac{10 \times 0.791 \times 99.98}{74.12} = 10.67 \text{ mol}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลาย 1.0 M บิวทานอล ปริมาตร 100 ml คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(10.67 \text{ mol})(V_1) = (1.0 \text{ mol})(100 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ ml}}{10.67 \text{ ml}} = 9.37 \text{ ml}$$

การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน 0.2 mol

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = \frac{2 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 2 \text{ ml}$$

สารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.2 mol/L จะต้องใช้บิวทานอล 1.0 mol ปริมาตร 2 ml

สารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.4 mol/L จะต้องใช้บิวทานอล 1.0 mol ปริมาตร 4 ml

สารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.6 mol/L จะต้องใช้บิวทานอล 1.0 mol ปริมาตร 6 ml

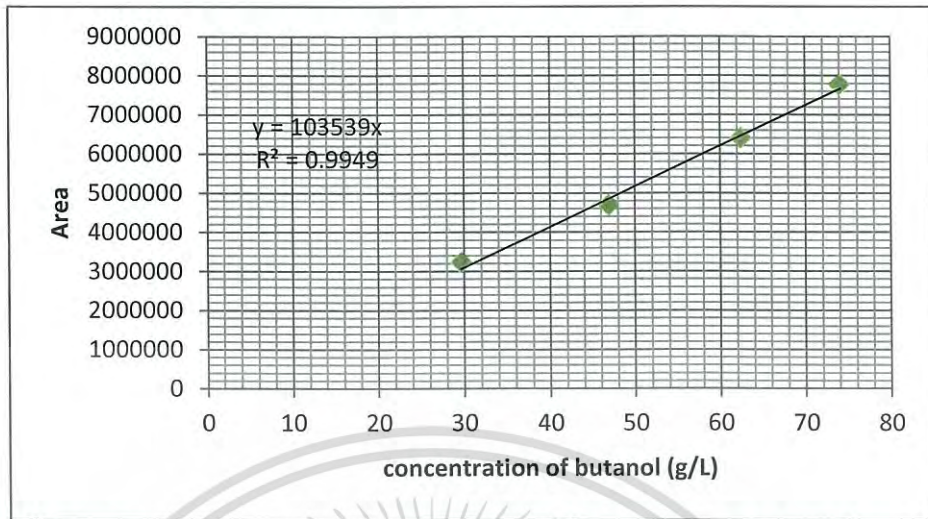
สารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.8 mol/L จะต้องใช้บิวทานอล 1.0 mol ปริมาตร 8 ml

สารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 1.0 mol/L จะต้องใช้บิวทานอล 1.0 mol ปริมาตร 10 ml

ตารางที่ ก.6 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายบิวทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นบิวทานอล มาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นบิวทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.0	0.00	0
0.2	14.824	1451218
0.4	29.648	3216721
0.6	46.873	4693774
0.8	62.497	6406110
1.0	74.122	7771094

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายบิวทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	1.4333	.11547	.06667
12	3	1.7667	.56862	.32830
24	3	1.7000	.51962	.30000
36	3	3.7000	3.29697	1.90351
48	3	1.2000	.36056	.20817
72	3	.7333	.11547	.06667
96	3	.5333	.05774	.03333
รวม	21	1.5810	1.46309	.31927

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
12.219	6	14	.000

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.566	6	3.261	1.964	.140
Within Groups	23.247	14	1.660		
Total	42.812	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	18.467	6	5.851	.001
Brown-Forsythe	1.964	6	2.283	.353

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
96	3	.5333	
72	3	.7333	
48	3	1.2000	
0	3	1.4333	1.4333
24	3	1.7000	1.7000
12	3	1.7667	1.7667
36	3		3.7000
Sig.		.309	.066

การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	42.67	2.517	1.453
12	3	37.33	1.528	.882
24	3	30.00	2.000	1.155
36	3	26.33	1.528	.882
48	3	32.33	1.528	.882
72	3	26.67	2.517	1.453
96	3	27.67	.577	.333
รวม	21	31.86	6.019	1.313

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.741	6	14	.626

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	676.571	6	112.762	32.889	.000
Within Groups	48.000	14	3.429		
Total	724.571	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	23.268	6	5.914	.001
Brown-Forsythe	32.889	6	10.225	.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
36	3	26.33				
72	3	26.67	26.67			
96	3	27.67	27.67			
24	3		30.00	30.00		
48	3			32.33		
12	3				37.33	
0	3					42.67
Sig.		42.67	.054	.145	1.000	1.000

การวิเคราะห์ทางสถิติค่าการดูดกลืนแสง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.23667	.005508	.003180
12	3	.43567	.263599	.152189
24	3	1.73367	.006692	.006692
36	3	1.73067	.017910	.017910
48	3	1.90467	.003283	.003283
72	3	1.79000	.000577	.000577
96	3	1.98367	.002028	.002028
รวม	21	1.40214	.153495	.153495

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.413	6	14	.000

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.754	6	1.626	161.057	.000
Within Groups	.141	14	.010		
Total	9.895	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	25669.485	6	5.557	.000
Brown-Forsythe	161.057	6	2.068	.005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.23667			
12	3		.43567		
36	3			1.73067	
24	3			1.73367	
72	3			1.79000	
48	3			1.90467	1.90467
96	3				1.98367
Sig.		1.000	1.000	.069	.352

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน

การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.3133	.08083	.04667
12	3	.5667	.23094	.13333
24	3	1.1667	.20817	.12019
36	3	1.5667	.41633	.24037
48	3	1.2333	.61101	.35277
72	3	.733	.35119	.20276
96	3	.7333	.46188	.26667
รวม	21	.9019	.51892	.11324

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.052	6	14	.126

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.412	6	.569	4.036	.015
Within Groups	1.973	14	.141		
Total	5.386	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	7.735	6	5.794	.014
Brown-Forsythe	4.036	6	8.286	.035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	.3133		
12	3	.5667	.5667	
72	3	.7333	.7333	
96	3	.7333	.7333	
24	3		1.1667	1.1667
48	3		1.2333	1.2333
36	3			1.5667
Sig.		.226	.068	.236

การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	45.00	1.000	.577
12	3	36.33	1.155	.577
24	3	32.33	1.528	.882
36	3	34.67	1.155	.667
48	3	33.67	1.155	.667
72	3	31.00	1.000	.577
96	3	29.33	1.528	.882
รวม	21	34.62	4.975	1.086

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.333	6	14	.908

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	473.619	6	78.937	51.802	.000
Within Groups	21.333	14	1.524		
Total	494.952	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	43.796	6	6.207	.000
Brown-Forsythe	51.802	6	12.488	.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	29.33					
12	3	31.00	31.00				
72	3		32.33	32.33			
96	3			33.67	33.67		
24	3				34.67	34.67	
48	3					36.33	
36	3						36.33
Sig.		.120	.207	.207	.338	.120	1.000

การวิเคราะห์ทางสถิติค่าการดูดกลืนแสง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.47633	.004041	.002333
12	3	.67900	.003606	.002082
24	3	.69867	.005508	.003180
36	3	.79000	.003606	.002082
48	3	.85367	.001155	.000667
72	3	.86833	.026839	.015496
96	3	.89167	.005132	.002963
รวม	21	.75110	.139388	.030417

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.206	6	14	.001

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.387	6	.064	550.078	.000
Within Groups	.002	14	.000		
Total	.389	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	3254.165	6	5.777	.000
Brown-Forsythe	550.078	6	2.585	.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.47633					
12	3		.67900				
72	3			.69867			
96	3				.79000		
24	3					.85367	
48	3					.86833	
36	3						.89167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.119	1.000

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพดแทนกลูโคส

การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.5667	.20817	.12019
12	3	.3333	.25166	.14530
24	3	.4333	.23094	.13333
36	3	1.4000	.45826	.26458
48	3	.3333	.15275	.08819
72	3	.3333	.11547	.06667
96	3	.2333	.23094	.13333
รวม	21	.5190	.43774	.09552

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.532	6	14	.239

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.912	6	.485	7.386	.001
Within Groups	.920	14	.066		
Total	3.832	20			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	2.104	6	6.123	.191
Brown-Forsythe	7.386	6	7.504	.008

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
96	3	.2333	
12	3	.3333	
48	3	.3333	
72	3	.3333	
24	3	.4333	
0	3	.5667	
36	3		1.4000
Sig.		.174	1.000

การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	46.33	1.155	.667
12	3	43.00	1.000	.577
24	3	36.00	1.000	.577
36	3	31.33	1.528	.882
48	3	32.00	1.732	1.000
72	3	33.67	.577	.333
96	3	29.33	1.528	.882
รวม	21	35.95	6.136	1.339

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.966	6	14	.482

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	730.286	6	121.714	75.176	.000
Within Groups	22.667	14	1.619		
Total	752.952	20			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	57.788	6	6.095	.000
Brown-Forsythe	75.176	6	10.804	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
96	3	29.33				
36	3	31.33	31.33			
48	3		32.00			
72	3		33.67			
24	3			36.00		
12	3				43.00	
0	3					46.33
Sig.		.075	.050	1.000	1.000	1.000

การวิเคราะห์ทางสถิติค่าการดูดกลืนแสง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.54633	.003512	.002028
12	3	.57100	.003606	.002082
24	3	2.05500	.010000	.005774
36	3	2.42833	.017559	.010138
48	3	2.78667	.020817	.012019
72	3	2.12167	.148857	.085942
96	3	1.94333	.045092	.026034
รวม	21	1.77890	.835440	.182308

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.242	6	14	.000

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.909	6	2.318	647.571	.000
Within Groups	.050	14	.004		
Total	13.959	20			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	13461.850	6	5.908	.000
Brown-Forsythe	647.571	6	2.535	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.54633				
12	3	.57100				
96	3		1.94333			
24	3			2.05500		
72	3			2.12167		
36	3				2.42833	
48	3					2.78667
Sig.		.621	1.000	.194	1.000	1.000

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่ใช้น้ำตาลจากการย่อยซังข้าวโพด แทนกลูโคส วิตามินและเกลือแร่

การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักเซลล์แห้ง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	1.1000	.26458	.15275
12	3	.7000	.20000	.11547
24	3	2.3000	.78102	.45092
36	3	2.9000	.52915	.30551
48	3	2.9000	.30000	.17321
72	3	3.1667	.32146	.18559
96	3	2.6667	1.16762	.67412
รวม	21	2.2476	1.04576	.22820

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.036	6	14	.041

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.759	6	2.793	7.648	.001
Within Groups	5.113	14	.365		
Total	21.872	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	23.728	6	6.103	.001
Brown-Forsythe	7.648	6	5.600	.015

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
12	3	.7000	
0	3	1.1000	
24	3		2.3000
96	3		2.6667
36	3		2.9000
48	3		2.9000
72	3		3.1667
Sig.		.431	.133

การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	45.67	.577	.333
12	3	36.00	1.000	.577
24	3	32.33	2.082	1.202
36	3	31.00	1.000	.577
48	3	35.00	1.000	.577
72	3	28.00	1.000	.577
96	3	30.67	2.082	1.202
รวม	21	34.10	5.594	1.221

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.618	6	14	.214

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	599.810	6	99.968	53.829	.000
Within Groups	26.000	14	1.857		
Total	625.810	20			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	115.707	6	6.112	.000
Brown-Forsythe	53.829	6	8.112	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
72	3	28.00			
96	3		30.67		
36	3		31.00		
24	3		32.33		
48	3			35.00	
12	3			36.00	
0	3				45.67
Sig.		1.000	.176	.384	1.000

การวิเคราะห์ทางสถิติค่าการดุดกคืนแสง

ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	3	.49400	.001000	.000577
12	3	1.59867	.945136	.545674
24	3	4.08500	.070534	.040723
36	3	3.39333	.018930	.010929
48	3	2.09333	.041932	.024210
72	3	1.93500	.044441	.025658
96	3	1.80333	.113725	.065659
รวม	21	2.20038	1.168232	.254929

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14.041	6	14	.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.465	6	4.244	32.459	.000
Within Groups	1.831	14	.131		
Total	27.295	20			

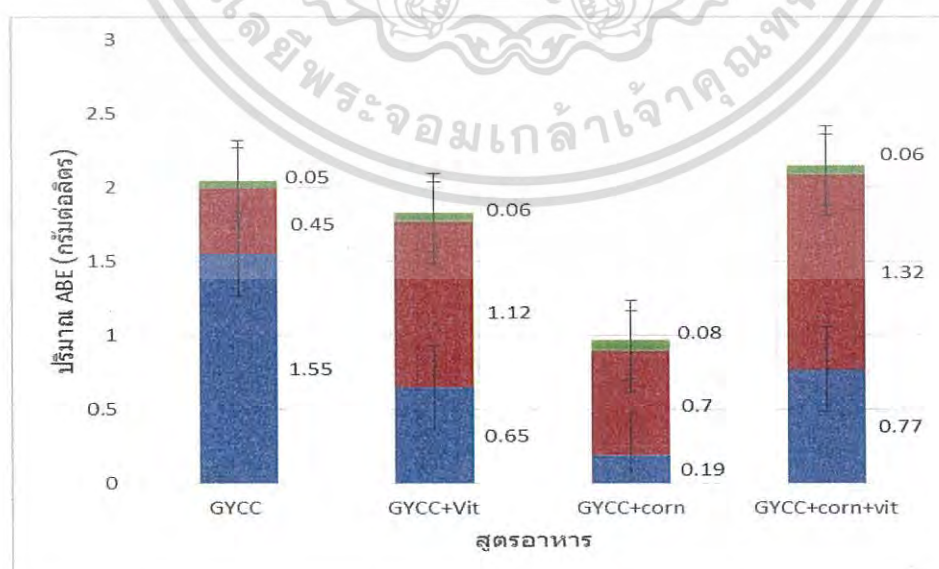
ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	8798.509	6	5.341	.000
Brown-Forsythe	32.459	6	2.099	.026

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.49400			
12	3		1.59867		
96	3		1.80333		
72	3		1.93500		
48	3		2.09333		
36	3			3.39333	
24	3				4.08500
Sig.		1.000	.144	1.000	1.000



รูปที่ ข.1 ปริมาณอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่สูงที่สุดในอาหาร GYCC แต่ละชนิด (■ อะซิโตน,

■ บิวทานอล และ ■ เอทานอล)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ด้วยอาหาร GYCC แบบต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ABE รวม	บิวทานอลที่ ชั่วโมงสูงสุด	เวลาที่บิวทานอลสูงสุด	ปริมาณ น้ำตาลที่ ใช้ไป	ค่าผลได้ของ ABE	ค่าผลได้ของบิว ทานอล	ค่าผลผลิตบิวทา นอล
GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่ง คาร์บอน	2.05	0.05	96	23.33	0.09	0.002	0.001
GYCC ที่เสริมด้วยวิตามิน และ เกลือแร่	1.83	0.06	12	13.67	0.13	0.004	0.005
GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดแทน น้ำตาลกลูโคส	0.98	0.08	72	16.33	0.06	0.005	0.001
GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดแทน น้ำตาลกลูโคสเสริมวิตามิน	2.15	0.06	36	19	0.11	0.003	0.002