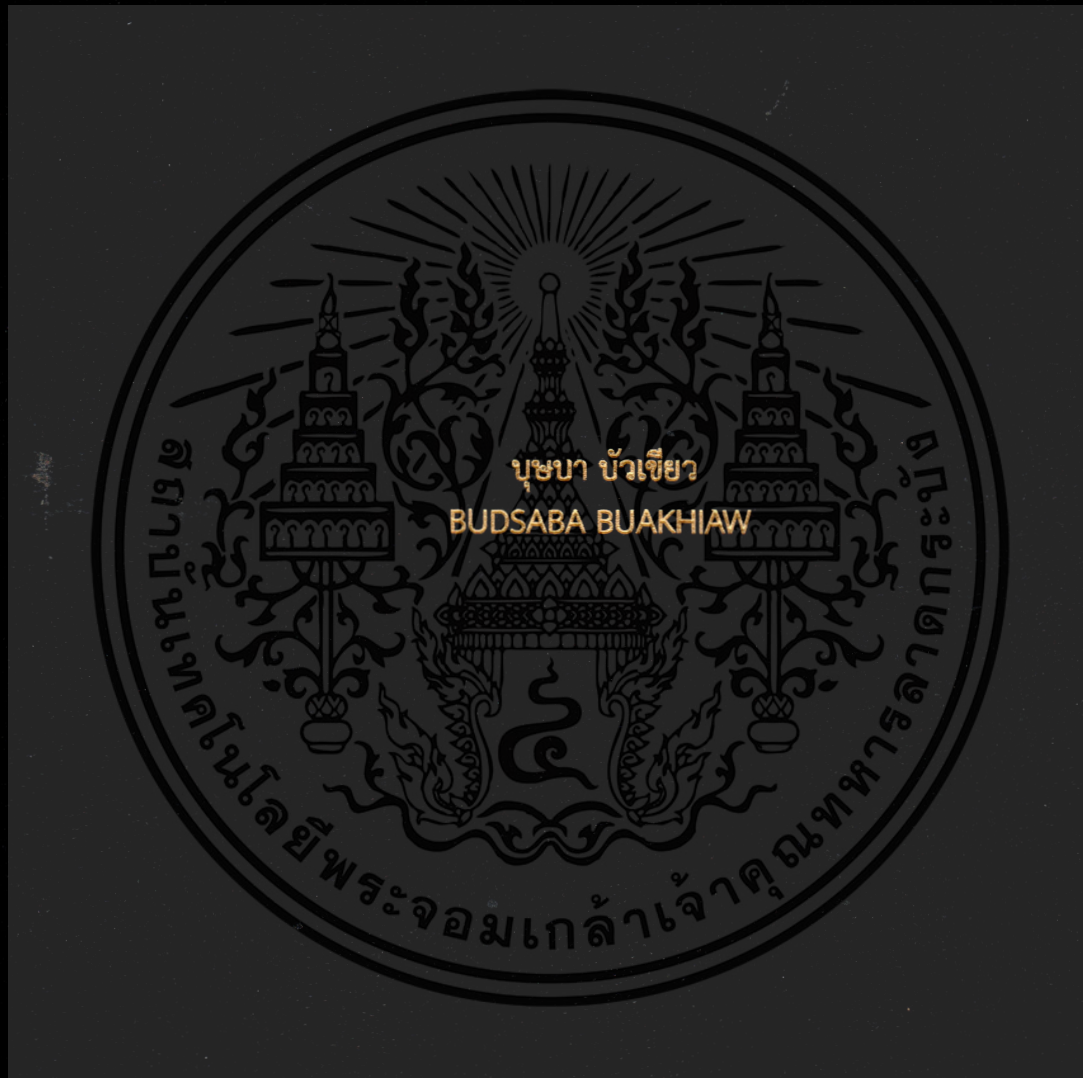


การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดิน
ธรรมชาติ ที่สามารถผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETONE-BUTANOL-
ETHANOL PRODUCING *Clostridium* spp. FROM NATURAL
SOIL SOURCES



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-020

การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดิน
ธรรมชาติ ที่สามารถผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETONE-BUTANOL-
ETHANOL PRODUCING *Clostridium* spp. FROM NATURAL
SOIL SOURCES



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาดมหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2560

KMITL-2017-SC-M-020-020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETONE-BUTANOL-
ETHANOL PRODUCING *Clostridium* spp. FROM NATURAL
SOIL SOURCES



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-SC-M-020-020

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ “การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินธรรมชาติที่สามารถผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล”
“ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACETONE-BUTANOL-ETHANOL PRODUCING *Clostridium* spp. FROM NATURAL SOIL SOURCES”

ชื่อนักศึกษา นางสาวบุษบา บัวเขียว
รหัสประจำตัว 58605050
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ดร.มนตรี ยะสาวงษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	   

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ วันอังคารที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2560 เวลา 09.30-12.30 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 301 อาคารพระจอมเกล้า

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว
(รองศาสตราจารย์ ดร.อิทธิพล แจ่มชัด)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์ “การคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดิน
ธรรมชาติ ที่สามารถผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล”
ชื่อนักศึกษา นางสาวบุษบา บัวเขียว
รหัสประจำตัว 58605050
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
พ.ศ. 2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

บิวทานอล เป็นหนึ่งในสารเคมีที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมและได้รับการยอมรับเพิ่มมากขึ้นว่าเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพทางเลือกที่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนจากแหล่งน้ำมันปิโตรเลียมที่มีอยู่อย่างจำกัดและลดลงอย่างต่อเนื่อง บิวทานอลผลิตได้โดยกระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE) โดยแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ซึ่งเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน และพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ เช่น แหล่งดินและน้ำ เป็นต้น เนื่องจากเชื้อเหล่านี้ยังผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงคัดแยกเชื้อ *Clostridium* sp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูง จากตะกอนดินในแหล่งน้ำและดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ 94 ไอโซเลต จากแบคทีเรียทั้งหมด 410 ไอโซเลต โดยที่ไอโซเลต G10 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด 5.89 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.06 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.52 กรัมต่อลิตร) ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินในแหล่งน้ำ และไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ -hemolytic) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร blood agar จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่า *Clostridium* sp. G10 มีความใกล้เคียงกับ *C. diolis* DSM 5431 (99.30 %) และ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (99.23 %) เมื่อทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) พบว่า *Clostridium* sp. G10 แตกต่างจาก *C. beijerinckii* คือ *Clostridium* sp. G10 ไม่สามารถใช้แลคโตส และ อินซิทัล เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และแตกต่างจากเชื้อ *C. diolis* คือ *Clostridium* sp. G10 สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้

จากนั้นได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิต ABE พบว่าเชื้อ *Clostridium* sp.

G10 สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดในอาหาร T6 คือ 13.49 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งหมด 16.22 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.63 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร) เมื่อควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่แตกต่างกันในช่วง pH 5.0-6.5 ผลผลิตบิวทานอลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด 12.04 กรัมต่อลิตรและตัวทำละลายทั้งหมด 14.83 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.51 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.28 กรัมต่อลิตร) ที่ pH เริ่มต้น 6.0 และการหมักที่ความเข้มข้นกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.64 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.05 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.31 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.11 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายเปลือกเหือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในการหมักแทนกลูโคส สามารถผลิตบิวทานอลได้ 10.67 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.37 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.80 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.90 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงสามารถผลิตบิวทานอลโดยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ และใช้เปลือกเหือกซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตบิวทานอลได้

คำสำคัญ : การคัดแยกแบคทีเรีย กระบวนการหมัก ABE แบคทีเรียไม่ใช้อากาศ บิวทานอล เปลือกเหือก อาหาร T6 *Clostridium beijerinckii* *Clostridium diolis*

Thesis Title	Isolation and Identification of Acetone-Butanol-Ethanol Producing <i>Clostridium</i> spp. from Natural Sources
Student Name	Miss Budsaba Buakhiaw
Student ID	58605050
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Year	2017
Thesis Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

Abstract

Butanol is one of the most important chemicals in the industry and is increasingly recognized as an alternative biofuel, which is capable of using as a renewable source of continuously decreased petroleum. Production of butanol can be achieved by acetone-butanol-ethanol fermentation (ABE fermentation) using *Clostridium* sp., anaerobic bacteria grown in natural sources, e.g. soils and sediment in water. Due to low butanol concentration production of these bacteria, this research has been interested in the Isolation of high butanol concentration producing *Clostridium* sp. from sediment in water and agricultural soils cultivated with different plants. It has been found that among 410 isolates, there were 94 bacterial isolates capable of producing butanol. The highest butanol concentration of 5.89 g/L was obtained from G10 isolated from sediment in water with 6.90 g/L total solvents (2.06 g/L acetone and 0.52 g/L ethanol). This isolate did not hemolyse red blood cells (γ -hemolytic) when examined on blood agar. A comparison of the 16S rRNA gene sequences in the EzBioCloud database revealed that *Clostridium* sp. G10 was closely related to *C. diolis* DSM 5431 (99.30 %) and *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (99.23 %). Biochemical test of this isolate showed that *Clostridium* sp. G10 was slightly different from *C. beijerinckii*. It could not utilize lactose or inositol as a carbon source. The

difference between *Clostridium* sp. G10 and *C. diolis* was the starch utilization as a carbon source of *Clostridium* sp. G10.

Subsequently, the effects of medium compositions and cultivation conditions on the solvent production were studied. *Clostridium* sp. G10 produced the maximum butanol concentration in T6 medium (13.49 g/L) with 16.22 g/L total solvent (2.63 g/L acetone and 0.10 g/L ethanol). When the effect of the initial pH (5.0-6.5) were investigated, the results showed that there was no significant difference on the butanol production ($p < 0.05$). The initial pH of 6.0 caused the butanol production of 12.04 g/L and the total solvent concentration was 14.83 g/L (2.51 g/L acetone and 0.28 g/L ethanol). Afterwards, the various glucose concentrations were fermented by *Clostridium* sp. G10, the highest butanol concentration of 11.64 g/L and 14.05 g/L total solvents (2.31 g/L acetone and 0.11 g/L ethanol) were found with the addition of 60 g/L glucose in T6 medium. Compared with the fermentation using taro peel hydrolysate in T6 medium, *Clostridium* sp. G10 produced 10.67 g/L butanol with total solvents of 13.37 g/L (1.80 g/L acetone and 0.90 g/L ethanol). Hence, *Clostridium* sp. G10 could produce butanol and, furthermore, has been able to utilize taro peel, an industrial waste, as a substrate in the production of biobutanol.

Keywords : Bacteria isolation, ABE fermentation, Anaerobic bacteria, Butanol, Taro peel, T6 medium, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium diolis*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากข้าพเจ้าได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดีในทุกขั้นตอน และเสนอแนะแนวทางการแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้วิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย ที่กรุณาให้เกียรติเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณ ดร.มนตรี ยะสว่างษ์ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นผู้ทรงคุณวุฒิการสอบวิทยานิพนธ์ และยังเป็นผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบความถูกต้องรวมทั้งให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้มอบทุนสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ และคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และประสบการณ์ในการศึกษาที่มีคุณค่ายิ่งจนประสบความสำเร็จตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านอุปกรณ์ เครื่องมือสารเคมี และสถานที่ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอขอบคุณ เกษตรกรทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ตลอดจนให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างดิน และบริษัท เพอร์ซิเดนท เบเกอร์ จำกัด (มหาชน) นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ที่ให้ความอนุเคราะห์เปลือกเผือกโดยไม่คิดค่าใช้จ่าย

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัวที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน และสนับสนุนปัจจัยต่างๆ ให้ได้ศึกษาเล่าเรียน รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ ๆ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้คำปรึกษา

บุษบา บัวเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 บิวทานอล.....	5
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป.....	5
2.1.2 คุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิง.....	7
2.1.3 ประวัติการผลิตบิวทานอล.....	8
2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล	8
2.1.5 ชีวเคมีในกระบวนการหมัก.....	9
2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล.....	12
2.1.7 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้.....	14
2.2 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตบิวทานอล.....	14
2.2.1 เชื้อ <i>Clostridium</i>	14
2.2.2 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	15
2.2.3 <i>Clostridium beijerinckii</i>	17
2.3 แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน	18
2.3.1 การจำแนกแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน.....	18
2.3.2 ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของ Anaerobic bacteria.....	19
2.3.3 เทคนิคการบ่มเพาะเชื้อ	21
2.4 ความหลากหลายของ <i>Clostridium</i>	22
2.4.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดจำแนก.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 อนุกรมวิธาน (Taxonomic).....	25
2.4.3 การใช้โปรแกรมสารสนเทศในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	28
2.5 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรีย.....	28
2.5.1 การใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต.....	28
2.5.2 การใช้โปรตีนในการเจริญเติบโต.....	30
2.5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์.....	31
2.5.4 ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตของ Clostridia และ.....	31
ลักษณะทางฟีโนไทป์	
2.6 เผือก (Taro).....	34
2.6.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเผือก.....	35
2.7 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment).....	39
2.7.1 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางกายภาพ (Physical pretreatment).....	40
2.7.2 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological pretreatment).....	40
2.7.3 เอนไซม์อะไมเลส (amylase).....	41
2.7.4 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase).....	41
2.7.5 เอนไซม์ ACCELLERASE 1500.....	42
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	43
2.8.1 การคัดแยกเชื้อ Clostridium.....	43
2.8.2 การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมมาเป็น.....	44
สารตั้งต้นในการหมัก ABE	
2.8.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก ABE.....	46
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	48
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	48
3.1.1 ตัวอย่างและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	48
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	50
3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	50
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	51
3.2.1 การเก็บตัวอย่าง.....	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 การเพาะเลี้ยงแบบคที่เรียและสภาวะในการเจริญเติบโต	51
3.2.3 การแยกเชื้อ <i>Clostridium</i>	52
3.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>Clostridium</i> spp. ที่สามารถผลิต ABE ได้สูง.....	53
3.2.5 การวิเคราะห์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic Analysis).....	53
3.2.6 การระบุสายพันธุ์เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA.....	53
3.3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ที่คัดแยกได้	56
3.2.8 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ด้วยการทดสอบ.....	57
ทางชีวเคมี (Biochemical test)	
3.2.9 สภาวะในกระบวนการหมัก	60
3.2.10 การใช้เปลือกฝือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบ	61
ในกระบวนการหมัก	
3.3 การวิเคราะห์ผลการวิจัย	61
3.3.1 ความเข้มข้นอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล	61
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	62
3.3.3 การคำนวณค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก	63
(productivity)	
3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	63
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	64
4.1 การคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิต ABE	64
4.2 วิเคราะห์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic Analysis).....	70
4.3 ระบุสายพันธุ์เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA	71
4.3.1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp.....	72
ที่คัดแยกได้	
4.4 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test).....	77
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Clostridium</i>	79
4.6 สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก.....	79
4.6.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล	81
4.6.2 ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล.....	84
4.6.3 ความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล.....	88
4.7 การใช้เปลือกฝือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.7.1 การย่อยเปลือกฝือกด้วยเอนไซม์.....	92
4.7.2 กระบวนการหมักเพื่อผลิต ABE.....	92
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	97
5.1 ข้อเสนอแนะ	98
บรรณานุกรม.....	100
ภาคผนวก.....	113
ภาคผนวก ก.....	114
ภาคผนวก ข.....	118
ภาคผนวก ค.....	119
ภาคผนวก ง.....	125
ภาคผนวก จ.....	132
ประวัติผู้เขียน.....	212



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะทางกายภาพของบิวทานอล.....	6
2.2 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล.....	6
2.3 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักอะซิโตนและบิวทานอล ในถังหมักขนาด..... 90 ลูกบาศก์เมตร โดยใช้น้ำตาล 5.5 ตัน	9
2.4 สายพันธุ์ <i>Clostridium</i> ที่จัดจำแนกอยู่ใน cluster I และเป็นตัวแทนของสกุล..... (genus) <i>Clostridium sensu stricto</i>	26
2.5 การย่อยคาร์โบไฮเดรตและลักษณะทางพีโนไทป์ของ <i>Clostridium</i> 4 สายพันธุ์..... ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้	33
2.6 ส่วนประกอบของลิโปแซลลูโลสในพีซีที่มีระบบท่อลำเลียง.....	36
3.1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำและดินเพาะปลูกพืช.....	49
3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	55
4.1 แหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในเบื้องต้น.....	66
4.2 ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่คัดแยกได้..... ในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ ไร้ออกซิเจน	67
4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต G10 กับ..... เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ในฐานข้อมูล EzBioCloud	75
4.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต H5 กับ..... เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. ในฐานข้อมูล EzBioCloud	76
4.5 ลักษณะพีโนไทป์ของ <i>Clostridium</i> sp. G10 และ <i>Clostridium</i> sp. H5 จากการ..... ทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับลักษณะพีโนไทป์ของ <i>C. beijerinckii</i> และ <i>C. diolis</i>	78
4.6 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในอาหาร 4 ชนิด..... คือ RCM, T6, GYCC และ P2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	84
4.7 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในอาหาร T6 ที่ค่า pH..... เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	86
4.8 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย เชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในอาหาร T6..... ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9 การผลิตอะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G1096 ที่คัดแยกได้ โดยใช้เปลือกเผือกกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร T6 ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	
จ-1 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก132 อาหาร RCM ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-2 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส134 และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร RCM ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-3 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก136 อาหาร T6 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-4 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส138 และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-5 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก141 อาหาร GYCC ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-6 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส143 และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร GYCC ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-7 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก146 อาหาร P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-8 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส148 และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-9 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก151 (productivity) ในอาหาร RCM, T6, GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-10 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่า152 ประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร RCM ,T6, GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-11 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก153 (productivity) ในอาหาร RCM, T6, GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-12 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่า153 ประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร RCM, T6, GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต่อ ฝัางอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ-13 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก155 อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	155
จ-14 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส157 และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	157
จ-15 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่าง160 การหมักอาหาร ที่ pH เริ่มต้น 5.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	160
จ-16 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ162 ค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	162
จ-17 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่าง165 การหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	165
จ-18 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ167 ค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	167
จ-19 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่าง170 การหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	170
จ-20 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ172 ค่า pH ระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	172
จ-21 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก175 (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	175
จ-22 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และ175 ค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	175
จ-23 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก177 (productivity) อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	177
จ-24 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และ177 ค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	177

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต่อ ฝัางอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ-25 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก.....179 อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-26 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ.....181 ค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-27 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก.....184 อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-28 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ.....186 ค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-29 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก.....189 อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-30 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ.....191 ค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-31 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก.....194 อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-32 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ.....196 ค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-33 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก.....199 (productivity) อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-34 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และ.....199 ค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-35 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก201 (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต่อ ฐิางอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
จ-36 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่า.....201 ประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-37 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในการหมักเปลือก.....203 เผือก ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-38 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และ205 ค่า pH ในการหมักเปลือกเผือก ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-39 ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้การหมักเปลือกเผือกและหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ.....208 <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-40 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้การหมักเปลือกเผือก.....209 และหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-41 ความเข้มข้นของ ABE ที่ได้การหมักเปลือกเผือกและหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ.....210 <i>Clostridium</i> sp. G10	
จ-42 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้น ABE ที่ได้การหมักเปลือกเผือก.....211 และหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10	

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของบิวทานอล	5
2.2 ปฏิกริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย <i>Clostridium</i> sp. ในการสร้างกรดอินทรีย์.....	11
(Acidogenic phase) และตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)	
2.3 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย <i>Clostridium acetobutylicum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	16
อิเล็กตรอน (SEM)	
2.4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย <i>Clostridium acetobutylicum</i>	16
2.5 การเปรียบเทียบเชื้อ <i>Clostridium</i> ใน clusters I และ II	27
2.6 การย่อยซีเตรตด้วยเอนไซม์	24
2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเผือก	35
2.8 ลักษณะของผลเผือก.....	35
2.9 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	37
2.10 โครงสร้างของเอมิเซลลูโลส	37
2.11 สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ลิกนินประกอบด้วย p-hydroxycinnamylalcohol.....	38
3 ชนิด	
2.12 การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) ในการเปลี่ยนแปลงมวลชีวภาพลิกโนเซลลูโลส	39
2.13 กลไกการทำงานของเซลลูเลส	42
3.1 แผนที่ในการเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า.....	48
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	
4.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของโคลินีเดียที่คัดแยกได้จากตะกอนดินในสระน้ำหลังอาคาร	64
เรียนตึกพระเทพฯ บนเพลทอาหารแข็ง RCM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ ไร้ออกซิเจน	
4.2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ <i>Clostridium</i> sp. ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินในแหล่งน้ำ.....	71
บนเพลทอาหาร blood agar	
4.3 ความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	72
4.4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. H5.....	70
<i>Clostridium</i> sp. G10 และ <i>Clostridium</i> spp. วิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้ โปรแกรม MEGA7 เปรียบเทียบ taxa ที่เกี่ยวข้องกันด้วยค่า bootstrap 1000 ครั้ง และ วิเคราะห์ความยาวของกิ่งสาขา (branches) ด้วยวิธี Maximum Composite Likelihood	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 (ซ้าย) และ <i>Clostridium</i> sp. H5 (ขวา)	80
4.6 อัตราการเจริญเติบโต (OD_{600}) ของ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในกระบวนการหมักของอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	81
4.7 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในอาหาร 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	83
4.8 อัตราการเจริญเติบโต (OD_{600}) ของ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในกระบวนการหมัก ABE ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	85
4.9 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	87
4.10 อัตราการเจริญเติบโต (OD_{600}) ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ในกระบวนการหมัก ABE ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	88
4.11 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	90
4.12 กระบวนการหมัก ABE โดย <i>Clostridium</i> sp. G10 เปรียบเทียบการใช้เปลือกเฟือกกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน	94
ค-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยการวัดด้วยวิธี DNS	120
ค-2 กราฟมาตรฐานบิวทานอล ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	122
ค-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	123
ค-4 กราฟมาตรฐานอะซีโตน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	124
ง-1 การทดสอบการผลิตอะซีโตนของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว RCM	125
ง-2 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 (1) และ <i>Clostridium</i> sp. H5 (2)	125
ง-3 ผลการทดสอบการสร้างสารอินโดล (Indole) ของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 (1) และ <i>Clostridium</i> sp. H5 (2)	126
ง-4 ผลการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทของเชื้อ <i>Clostridium</i> sp. G10 (1) และ <i>Clostridium</i> sp. H5 (2)	126
ง-5 ผลการทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin)	127

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ง-6 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไรโบส (ribose) (1) และ อินอซิทอล127 (Inositol) (2)	
ง-7 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) (1) ซอร์บิทอล128 (Sorbitol) (2) แรมโนส (Rhamnose) (3) และแลคโตส (Lactose) (4)	
ง-8 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลมอลโตส (Maltose) (1) แซคคาโรส129 (Saccharose) (2) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucoopyranoside) (3) และเด็กซ์ตริน (Dextrin) (4)	
ง-9 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลทรีฮาโรส (Threhalose) (1) ดัลซิทอล130 (Dulcitol) (2) กลีเซอรอล (Glycerol) (3) และอะราบินอส (Arabinose) (4)	
ง-10 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโรส (Xylose) (1) กลูโคส (Glucose).....131 (2) แมนโนส (Mannose) (3) และเซลโลไบโอส (Cellobiose) (4)	

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บิวทานอล ถือเป็นหนึ่งในพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับ ความสนใจเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมนุษย์มีความต้องการใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แหล่งพลังงานจากน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีอยู่อย่างจำกัดลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงได้มีการค้นหาแหล่งพลังงานทดแทนหรือพลังงานทางเลือกชีวภาพเพื่อนำมาใช้แทนพลังงานจากปิโตรเลียม ซึ่งแหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ที่ได้รับ ความสนใจในการพัฒนาเป็นพลังงานทดแทนคือบิวทานอล เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานต้นทุนต่ำ มีการหมุนเวียนพลังงานที่ดี และเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพที่มีจุดเด่นเหนือกว่าเอทานอล เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี รวมทั้งคุณสมบัติทางด้านพลังงานแล้ว บิวทานอลมีค่าออกเทนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนมากกว่า ให้ค่าพลังงานและมีจุดเดือดที่สูงกว่าเอทานอล (Huber. *et al.*, 2006, Dürre, 2007) อีกทั้งยังสามารถใช้บิวทานอลกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ นอกจากนี้การเผาไหม้เครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสมพบว่าการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนโตรสออกไซด์ที่เป็นมลภาวะต่อสภาพแวดล้อมมีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมากเมื่อเทียบกับแก๊สโซลีน อีกทั้งบิวทานอลยังสามารถขนส่งตามท่อส่งน้ำมันที่มีอยู่เดิมได้ เนื่องจากมีการดูดซับความชื้นและการระเหย (Volatility) ต่ำกว่า และไม่เกิดการกัดกร่อนเมื่อเทียบกับเอทานอล (Lee. *et al.*, 2008a) นอกเหนือจากนำมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญกับอุตสาหกรรมต่างๆ อีกมากมาย โดยอนุพันธ์ของบิวทานอลที่อยู่ในรูปของ Butyl acrylate และ Methacrylates esters ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว (Enamels) วัสดุสิ่งทอ (Textile) และพลาสติก เป็นต้น และยังใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามิน และฮอร์โมนได้อีกด้วย (Lee. *et al.*, 2008b; Dürre, 2008)

กระบวนการผลิตบิวทานอลสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันนิยมผลิตด้วยกระบวนการทางเคมีมากกว่าเนื่องจากต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ในการผลิตต้องอาศัยวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นจากทรัพยากรปิโตรเลียมที่มีอยู่อย่างจำกัดและทำให้ทรัพยากรปิโตรเลียมมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้อุตสาหกรรมหันมาสนใจในการผลิตทางชีวภาพมากขึ้นเรื่อยๆ (Demirbas. *et al.*, 2008) ด้วยกระบวนการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE) โดยแบคทีเรียสกุล *Clostridium* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) และสามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี ลักษณะของเซลล์เมื่อสร้างสปอร์คล้ายคลึงกับไม้ตีกลองหรือไม้เทนนิส สามารถพบกระจาย

ทั่วไปในธรรมชาติ เจริญได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อีกทั้งแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ได้ถูกจำแนกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลาย ABE ให้ได้ผลผลิตมากที่สุด โดยสายพันธุ์ที่นิยมนำมาศึกษากันเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum*, *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูง (Keis. *et al.*, 2001) แต่แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่นิยมนำไปใช้ในกระบวนการหมัก ABE ในอุตสาหกรรม (Jones and Woods, 1986) รวมทั้งสายพันธุ์ *C. beijerinckii* ก็นิยมใช้ในกระบวนการหมัก ABE ซึ่งให้ผลดีเช่นกัน โดยแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้สามารถใช้วัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล (Molasses) สารชีวมวลทางการเกษตร (Agricultural biomass) เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวเจ้า ข้าวไรย์ มันสำปะหลัง และของเสียจากอุตสาหกรรมนม (Dairy industrial waste) เป็นต้น (Campos. *et al.*, 2002) โดยขั้นตอนในเมแทบอลิซึมของการหมัก ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. นั้น ประกอบด้วยสองระยะ กล่าวคือระยะแรกเป็นระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ซึ่งวิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะน้ำตาล 5 และ 6 คาร์บอนให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดบิวทิริก (Butyric acid) และกรดอะซิติก (Acetic acid) เกิดขึ้นในช่วงระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase หรือ log phase) ที่ 7-18 ชั่วโมงแรก จึงเป็นเหตุทำให้ค่า pH ในน้ำหมักลดลง และระยะที่สองเป็นระยะของการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ปกติเกิดภายหลังจากเริ่มการหมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง โดยเซลล์จะดูดซึมกรดกลับเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ ในช่วงนี้ค่า pH ของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักยังมีการสร้างแก๊สไฮโดรเจนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดกระบวนการหมักด้วย ซึ่งผลได้ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปจะได้อัตราส่วนบิวทานอลต่ออะซิโตนต่อเอทานอล ในอัตราส่วน 6: 3: 1 (Jones and Woods, 1986; Schuster. *et al.*, 1998; Badr. *et al.*, 2001)

โดยทั่วไปค่าความเข้มข้นตัวทำละลาย ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. มีตั้งแต่ 0.9 จนถึงสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร และมีอัตราในการผลิต ABE อยู่ที่ 0.04 ถึง 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งความสามารถในการผลิต ABE นี้ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สารตั้งต้นที่ใช้ อุณหภูมิ และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เป็นต้น (Ennis and Maddox, 1989) แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการผลิตทางชีวภาพยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ได้ผลผลิต ABE ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่ากระบวนการผลิตทางเคมีเนื่องจากเกิดความเป็นพิษของ ABE ต่อเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมัก ตามหลักการแล้วผลผลิต ABE ที่ความเข้มข้นสูงจนถึงจุดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเมื่อเซลล์มีการสะสมสารพิษนั้นจนมากเกินไปเกินเซลล์จะหยุดการเจริญและตายในที่สุด อีกทั้งค่าใช้จ่ายในกระบวนการเก็บเกี่ยว (Down-stream processing) ABE นั้น มีต้นทุนสูงเนื่องจากความเข้มข้นของผลผลิตต่ำ ด้วยเหตุนี้ทำให้กระบวนการผลิตทางชีวภาพไม่สามารถแข่งขันได้กับกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ เช่น ในดิน บึง หนอง เือกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขยะ อาหาร และสัตว์ รวมถึงการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิต ABE มากที่สุด ได้แก่ การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อีกทั้งยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปปรับประยุกต์ใช้และพัฒนากระบวนการหมัก ABE ในระดับอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารอย่างเปลือกเผือกมาเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร และตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่ง
2. เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ ที่มีความสามารถผลิตบิวทานอลได้สูง ด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลของเชื้อ *Clostridium* sp. ที่แยกได้
4. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเปลือกเผือกที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์มาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ทำการคัดแยกและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตรในจังหวัดพะเยา และตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่งบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ด้วยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว T6 ระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale)
3. ศึกษาหาสภาวะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์และปรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป
4. ทำการย่อยเปลือกเผือกซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารด้วยเอนไซม์ต่างๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ABE

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* sp. ที่สามารถผลิต อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อเพิ่มอัตราส่วนผลผลิตให้มากขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้
3. นำเปลือกเผือกซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ABE ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-73-76) เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปในชื่อของ Butyl alcohol หรือ n-butanol และเรียกว่า biobutanol ในกรณีที่เกิดมาจากระบวนการทางชีวภาพ บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์พื้นฐานที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 อะตอมสายตรง (Primary alcohol) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) สูตรโมเลกุลคือ C_4H_9OH มีน้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล โดยมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของบิวทานอล

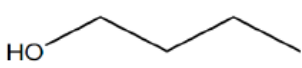
ที่มา (ออนไลน์): <http://eng.genetika.ru/aaa%20genetika/Articles/butanol.jpg>

(วันที่สืบค้น 29 พฤษภาคม 2559)

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

บิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ไร้ไฟ ละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี มีกลิ่นเฉพาะตัวคล้ายกลิ่นของกล้วย แต่มีกลิ่นแอลกอฮอล์ที่ชัดเจน บิวทานอลสามารถทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อสัมผัสโดยตรง โดยเฉพาะดวงตาและผิวหนัง ไอระเหยของบิวทานอลสามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อโพรงจมูกได้ (Lee. *et al.*, 2008; Dürre, 2008) นอกจากนี้ยังมีสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับบิวทานอล ได้แก่ เมทานอล (คาร์บอน 1 อะตอม) เอทานอล (คาร์บอน 2 อะตอม) และโพรพานอล (คาร์บอน 3 อะตอม) (Kristin, 2007) โดยสามารถสรุปคุณลักษณะของบิวทานอลทางกายภาพ ดังตารางที่ 2.1 และคุณลักษณะของบิวทานอลทางเคมี ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของบิวทานอล (Devis and Morton, 2008; Lee. *et al.*, 2008a)

คุณสมบัติ	บิวทานอล	โครงสร้างทางเคมี
จุดหลอมเหลว (°C)	-89.3	 <p>1-butanol</p>
ความถ่วงจำเพาะ	0.810-0.812	
จุดติดไฟ (°C)	35-37	
จุดลุกติดไฟได้เอง (°C)	343-345	
จุดวาบไฟ (°C)	25-29	
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (น้ำ: 1.0)	0.81	
ความดันวิกฤต (hPa)	48.4	
อุณหภูมิวิกฤต (°C)	287	
ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของก๊าซหรือไอระเหย (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในอากาศ)	1.4-11.3	
การละลายได้ในน้ำ 9.0 มิลลิลิตร ต่อ 100 มิลลิลิตร	7.7 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 20°C	
ความหนาแน่นไอสัมพัทธ์ (อากาศ: 1.0)	2.6	
ความดันไอ (kPa ที่ 20 °C)	0.58	

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีของบิวทานอล (Devis and Morton, 2008; Lee. *et al.*, 2008a)

	บิวทานอล	แก๊สโซลีน	เอทานอล	เมทานอล
จุดเดือด (°C)	117-118	27-221	78	64.7
ความหนาแน่นที่ 20 °C (g/mL)	0.8098	0.7-0.8	0.7851	0.7866
การละลายในน้ำ 100 กรัม	ผสมไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	ผสมไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	ผสมไม่เป็นเนื้อเดียวกัน	ผสมไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
ความหนาแน่นของพลังงาน (MJ·L ⁻¹)	27-29.2	32	19.6	16
ปริมาณความร้อนและค่าพลังงาน (BTU/gal)	110000	115000	84000	76000
อัตราส่วนผสมของอากาศกับเชื้อเพลิง	11.2	14.6	9	6.5
ความร้อนที่ต้องการเพื่อระเหยสารที่จุดเดือดปกติ (MJ/Kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
ความจุความร้อน (C _p) ที่ STP (kJ/kmol·K)	178	160-300	112.3	81.14
Research octane number	96	91-99	129	136
Motor octane number	78	81-89	102	104
สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำ และชั้นออกทานอล (logP _{o/w}) ^a	0.88	3.52±0.62	-0.31	-0.77
Dipole moment (การมีขั้ว)	1.66	ไม่มีข้อมูล	1.7	1.6
ความหนืด (10 ⁻³ Pa·s)	2.593	0.24-0.32	1.078	0.5445

หมายเหตุ: ^aLog P เป็นตัวชี้วัดการไม่ชอบน้ำ และการมีขั้ว สำหรับแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด ในน้ำมันเบนซิน Log P เป็นค่าประมาณค่าเฉลี่ยน้ำหนักของส่วนประกอบหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 คุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิง

ไบโอบิวทานอล เป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้ในอนาคตอันใกล้นี้ ถึงแม้ว่าในขณะนี้ด้วยเหตุผลหลายประการที่ทำให้เอทานอลยังคงเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมใช้มากกว่าก็ตาม อย่างไรก็ตามบิวทานอลจัดเป็นสารที่มีข้อดีกว่าเอทานอลหลายประการ คือมีความสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงใดๆ ในขณะที่การใช้เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของเอทานอลบางประการเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปเป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Hansen. *et al.*, 2005; Niven, 2005) เนื่องจากบิวทานอลมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและทางเคมี เช่น มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนมากกว่าเอทานอล รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล (Huber. *et al.*, 2006) เมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างบิวทานอลกับเอทานอล ดังตารางที่ 2.2 จะเห็นว่าบิวทานอลให้ค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีน (น้ำมันเบนซิน) มากกว่าเอทานอล ในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนจะต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่ออกมาเท่ากัน ซึ่งค่าพลังงานของบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 110,000 BTU ต่อแกลลอน ในขณะที่เอทานอลมีค่า 84,000 BTU ต่อแกลลอน และบิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนได้หลายอัตราส่วน เนื่องจากมีความเป็นขั้วต่ำกว่า ส่วนเอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้เพียงบางส่วนเท่านั้น (Atsumi. *et al.*, 2008) ยิ่งไปกว่านั้น บิวทานอลสามารถนำไปใช้ได้โดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์และไม่ส่งผลกระทบต่อเครื่องยนต์เลย ชนิกา และคณะ (2555) ได้กล่าวว่ามีการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเครื่องยนต์ใช้งานได้ตามปกติ โดยมีการใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีน 9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ถึงแม้ว่าเครื่องยนต์จะใช้บิวทานอลสูงกว่า แต่พบว่าการเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่ใช้บิวทานอลนั้นมีการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์ของไนโตรเจนออกไซด์ที่เป็นพิษ (NO_x) ลดลงมาก ซึ่งเป็นเรื่องที่สำคัญต่อสิ่งแวดล้อมอย่างมาก

คุณสมบัติอื่นๆ ของบิวทานอลที่เหนือกว่าเอทานอล ได้แก่ การระเหยเป็นไอ (Volatility) ของบิวทานอลต่ำกว่า จึงมีความเป็นพิษน้อยกว่า โดยมีค่า Reid Vapor Pressure (RVP) ต่ำกว่า 7.5 เท่า เมื่อเทียบกับเอทานอล โดยค่าแรงดันไอ (Vapor Pressure) ของบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอท ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำกว่าเอทานอล 11 เท่า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 45 มิลลิเมตรปรอท ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จึงสามารถผสมได้โดยตรงกับแก๊สโซลีนโดยไม่สูญเสียจากการระเหย ไม่มีผลกระทบข้างเคียงอื่นๆ และจะไม่เกิดการแยกชั้นในที่มีน้ำอยู่ก็ตาม บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้นจึงมีค่า Hygroscopicity ต่ำกว่า และบิวทานอลยังมีความสามารถในการกักความร้อนต่ำทำให้ปลอดภัยในการขนส่งตามระบบท่อส่งน้ำมัน ในขณะที่เอทานอลไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้เนื่องจากมีค่าความดันไอสูง (Dürre, 2007) อย่างไรก็ตาม บิวทานอลมีความหนืดเป็น 2 เท่าของเอทานอล และประมาณ 5 ถึง 7 เท่า ของแก๊สโซลีน (Wackett, 2008) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของบิวทานอล เช่น ความหนาแน่น และความจุความร้อนมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 2.2

2.1.3 ประวัติการผลิตบิวทานอล

การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1905 Schardinger ได้ค้นพบอะซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์ พาสเตอร์ ซึ่งเป็นกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล และในปี ค.ศ. 1912 ถึงปี ค.ศ. 1914 เชม วิทแมนน์ (Chaim Weizmann) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถผลิตอะซิโตนและบิวทานอลได้เรียกว่าไอโซเลต BY (Gabriel, 1928) ซึ่งต่อมาเรียกจุลินทรีย์นี้ว่า *Clostridium acetobutylicum* ในระยะแรกกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยใช้บิวทานอลมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเบตาไดอิน ส่วนอะซิโตนนั้นมีความสำคัญมากในช่วงนั้น โดยใช้อะซิโตนเป็นตัวทำละลายคอร์ดีท์ (Cordite) สำหรับเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตวัตถุระเบิด TNT (Trinitrotoluene) (Jones and Woods, 1986) ภายหลังจากสงครามยุติ ความต้องการอะซิโตนลดน้อยลงทำให้โรงงานเหล่านั้นต้องปิดตัวลง แต่อย่างไรก็ตาม บิวทานอลกลับมีความต้องการมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตรถยนต์และอุตสาหกรรมสีทา เนื่องจากบิวทานอลสามารถใช้เป็นตัวทำละลายไนโตรเซลลูโลสผสมในแล็กเกอร์ (Lacquer) ซึ่งเป็นสารเคลือบเงารถยนต์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 เริ่มมีการผลิตอะซิโตนและบิวทานอลได้ด้วยกระบวนการทางเคมีจากสารที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีต้นทุนถูกกว่าการผลิตโดยกระบวนการหมัก ทำให้โรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ในอเมริกาเริ่มมีการเปิดขึ้นใหม่ จนกระทั่งสิทธิบัตรโรงงานของวิทแมนน์ (Weizmann) สิ้นสุดลงจึงเกิดโรงงานเพื่อการผลิตอะซิโตนและบิวทานอลขึ้นอีกมากมาย ทั้งในญี่ปุ่น อินเดีย ออสเตรเลีย และอเมริกาใต้ โดยใช้แบคทีเรีย *C. acetobutylicum* เป็นหลักในการผลิต (Lee. et al., 1985)

2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล

กระบวนการหมัก ABE เป็นกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจน จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการให้ก๊าซออกซิเจนในกระบวนการหมัก และยังประหยัดพลังงานที่ต้องใช้ในการกวนผสมอีกด้วยเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบใช้ออกซิเจน ซึ่งกระบวนการผลิตบิวทานอลสามารถผลิตได้ 3 วิธี คือกระบวนการทางเคมี กระบวนการทางชีวภาพ และกระบวนการขั้นสูง แต่วิธีที่นิยมในปัจจุบันคือกระบวนการหมักทางชีวภาพโดยใช้แบคทีเรีย ซึ่งในกระบวนการหมักมักเรียกว่า การหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone-butanol-ethanol fermentation, ABE fermentation) โดยแบคทีเรียที่ใช้มักจะเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Clostridium* sp. เช่น *C. butylinum* และ *C. acetobutylinum* เป็นต้น เดิมทีนั้นแบคทีเรียในตระกูลนี้ใช้เพื่อผลิตอะซิโตนจากสารจำพวกแป้ง ซึ่งตอนนั้นบิวทานอลและเอทานอลเป็นผลพลอยได้ที่ได้ออกมาจากกระบวนการหมัก (สมใจ, 2550; Jones and Woods, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ได้จากกระบวนการหมักโดยทั่วไปคือ บิวทานอล: อะซิโตน: เอทานอล ในอัตราส่วน 6: 3: 1 ซึ่งผลผลิตทั้ง 3 ชนิด รวมกันมีค่าประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ผลพลอยได้ที่สำคัญที่ได้จากกระบวนการหมักนี้ ได้แก่ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถนำไปผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลวหรือน้ำแข็งแห้ง (dry ice) และบางส่วนนำไปใช้ในการรักษาภาวะไร้ออกซิเจนในถังหมักได้อีกด้วย (สมใจ, 2550)

การเก็บเกี่ยวอะซิโตนและบิวทานอลออกจากของเหลวที่ได้จากกระบวนการหมักทำได้โดยการกลั่น หลังจากนั้นก็แยกอะซิโตนออกจากบิวทานอลได้โดยการกลั่นลำดับส่วน หรือการเป่าไล่ด้วยแก๊ส (Gas stripping) โดยตัวทำละลาย ABE ที่ได้จะละลายในแก๊สและถูกพาออกจากถังหมัก และ ABE ถูกแยกออกจากกันโดยการควบแน่น เป็นต้น

ปัญหาที่มักพบในกระบวนการหมักอะซิโตนและบิวทานอล ได้แก่ การปนเปื้อนแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage) และแลคโตบาซิลไล (Lactobacilli) การป้องกันสามารถทำได้โดยการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก รวมทั้งก๊าซและสารที่เติมเข้าไปในถังหมัก ใช้เชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์ และรักษาสภาพปลอดเชื้อในระหว่างการหมัก (สมใจ, 2550)

ตารางที่ 2.3 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักอะซิโตนและบิวทานอล ในถังหมักขนาด 90 ลูกบาศก์เมตร โดยใช้น้ำตาล 5.5 ตัน (Crueger and Crueger, 1989)

ผลิตภัณฑ์	น้ำตาลที่เปลี่ยนไป (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณที่ผลิต (กิโลกรัม)
บิวทานอล	30 (อัตราส่วน 6: 3: 1)	1,053
อะซิโตน		526
เอทานอล		175
CO ₂	50	2900
H ₂	2	117

2.1.5 ชีวเคมีในกระบวนการหมัก

รูปแบบการหมักของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) ในระยะนี้แบคทีเรียจะผลิตกรดบิวทิริกและกรดอะซิติก ในช่วง 7-18 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นเหตุทำให้ค่า pH ในน้ำหมักลดลง และระยะที่สองคือการสร้างตัวทำละลาย ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยปกติจะเกิดหลังจากเริ่มการหมักไปแล้ว 18 ชั่วโมง จนถึง 36 หรือ 60 ชั่วโมง ทำให้ค่า pH ของน้ำหมักในช่วงนี้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีการนำกรดอินทรีย์บางส่วนที่ผลิตได้ในช่วงแรกมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตตัวทำละลาย นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมัก ยังมีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมาตลอดกระบวนการด้วย (Jones and Woods, 1986)

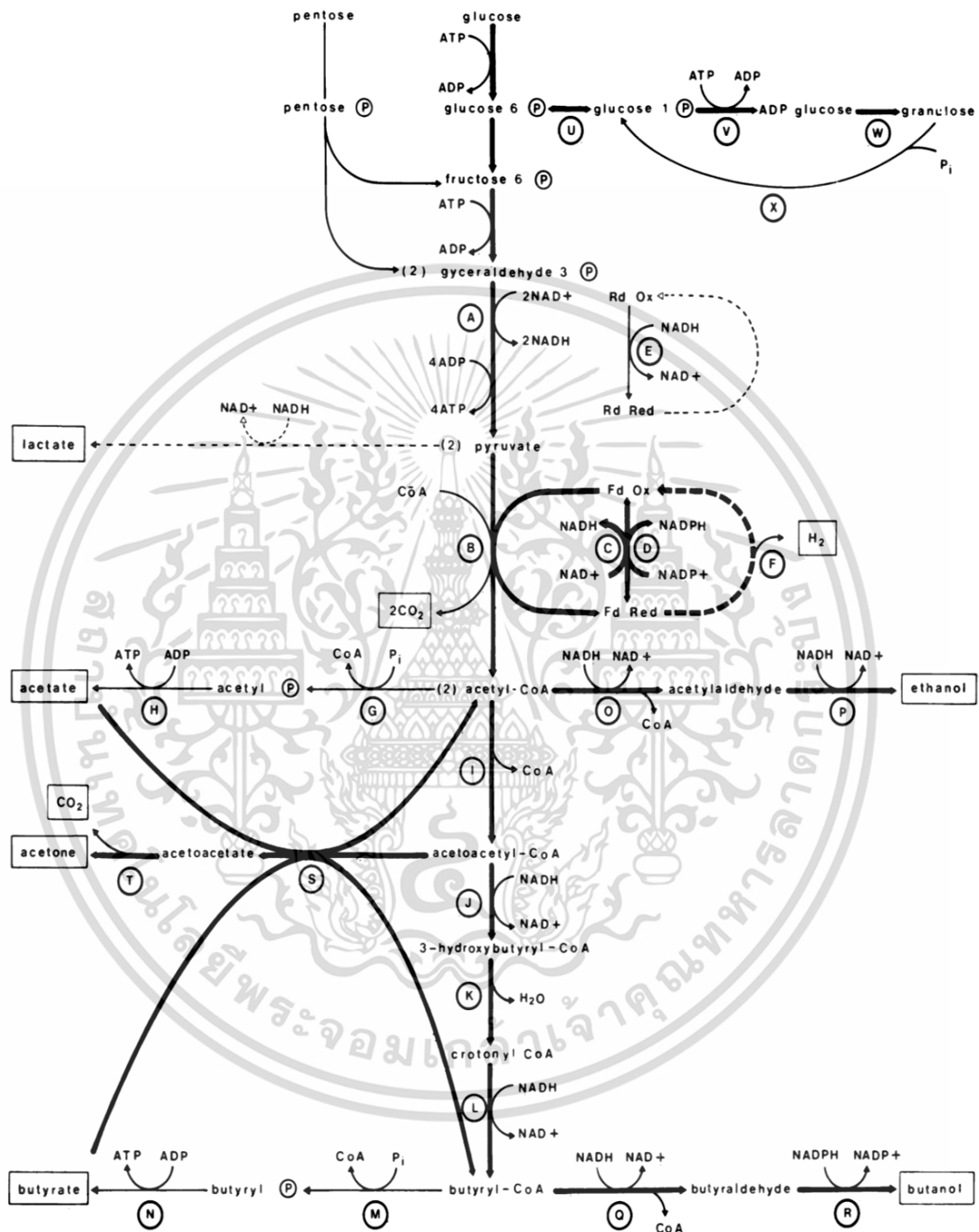
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิถีทางชีวเคมีของกลุ่ม *Clostridium* sp. จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรดอินทรีย์และตัวทำละลาย รวมทั้งก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยน้ำตาลในกลุ่ม Hexose (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden-Meyerhof glycolytic pathway (EMP) ในระหว่างการเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก น้ำตาล 1 โมเลกุลจะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP ออกมา 2 โมเลกุล และ $\text{NADH} + \text{H}^+$ 2 โมเลกุล ส่วนน้ำตาล Pentose (C5) ถูกเมตาบอไรซ์ (metabolized) ด้วยวิถี Pentose phosphate เกิดการสร้าง Fructose-6-phosphate และ Glyceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่ Embden-Meyerhof glycolytic pathway ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduced ferredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ทั้งหมด โดย Acetyl-CoA 2 โมเลกุล ถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริกโดยจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้างอะซิเตตด้วย ต่อมาอะซิเตตจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์ Acetoacetate decarboxylase ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับไม่ได้ (Jones and Woods, 1986) ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้นเพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA ถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลเกิดมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอลจะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกันผ่าน 2 ปฏิกิริยาโดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับใช้ $\text{NADH} + \text{H}^+$ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย (Jones and Woods, 1986)

เอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการสร้างกรดและสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ ในรูปที่ 2.2 แสดงตามตัวอักษรดังนี้: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH -ferredoxin oxidoreductase; (D) NADPH -ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphate acetyl transferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyl transferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyl transferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase และ (X) granulose phosphorylase



รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) (Jones and Woods, 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักและสามารถผลิตบิวทานอลได้ปริมาณสูงจำเป็นต้องมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในการหมักบิวทานอล ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพจากการผลิตกรดอินทรีย์ไปเป็นการผลิต ABE มีความยุ่งยากซับซ้อน จึงได้มีการศึกษาถึงสาเหตุที่มีผลต่อกระบวนการหมัก เพื่อกระตุ้นให้เกิดการผลิต ABE และรักษาสภาพในกระบวนการหมักให้ยาวนานที่สุดเท่าที่จะทำได้ (Lee. *et al.*, 2008b)

2.1.6.1 สารตั้งต้น

วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ ได้แก่ น้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตในรูปแบบต่างๆ ทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและพอลิเมอร์ ซึ่งอาจจำแนกได้ดังนี้ ประเภทแรกเป็นผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง และมันเทศ เป็นต้น ประเภทที่สองเป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล และหางนม เป็นต้น และประเภทที่สามเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว และซังข้าวโพด เป็นต้น

Ndaba. *et al* (2015) ได้ศึกษาการผลิตไบโอบิวทานอลและกรดอินทรีย์จากน้ำข้าวฟ่างหวาน ด้วยเชื้อ *C. acetobutylicum* และ *C. tetanomorphum* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในการหมักได้

โดยในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในขั้นตอนแรกจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เชื้อจุลินทรีย์ปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ เพื่อทำลายโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนให้แตกกลายเป็นโมเลกุลเดี่ยว (monomer) เช่น การย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส จากนั้นกลูโคสจะถูกย่อยสลายเป็นอะซิเตตและบิวทาเรตในช่วงการสร้างกรดอินทรีย์ และกรดอินทรีย์ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์โดยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจน

2.1.6.2 ความเข้มข้นของสารอาหาร

ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลอย่างมาก ถ้าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตร ทำให้กระบวนการหมักมุ่งเข้าสู่ระยะการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenesis phase) และผลิต ABE ได้เพียงเล็กน้อย (Lee. *et al.*, 2008b) แต่ถ้าความเข้มข้นสูงถึง 60 กรัมต่อลิตร ทำให้ความสามารถในการผลิต ABE เพิ่มขึ้น (Madihah. *et al.*, 2001) อย่างไรก็ตาม ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึง 80 กรัมต่อลิตร น้ำตาลถูกหมักได้น้อยลงซึ่งเกิดจากการยับยั้งของสารตั้งต้น (Qadee. *et al.*, 1980)

2.1.6.3 ออกซิเจน

Brien and Morris (1971) ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Obligate anaerobe) พบว่าการเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นในน้ำหมักที่มีความต่างศักย์ของ Redox (Redox potential; E_p) ในช่วงระหว่าง -250 mV ถึง -400 mV การสัมผัสกับออกซิเจนในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนอาจไม่เป็นอันตรายหากเกิดขึ้นในระยะเวลาอันสั้น แต่ถ้าน้ำหมักสัมผัสกับออกซิเจนในปริมาณมาก (40-60 μ M) การใช้กลูโคสของจุลินทรีย์จะลดลง การเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโต และการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีน จะหยุดชะงักภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) จุลินทรีย์อาจมีการผลิตบิวทิเรตแต่ไม่ผลิตอะซิเตตหรือมีการผลิตลดลง รวมถึงมีการลดลงของ ATP ในเซลล์ด้วย ซึ่งผลของออกซิเจนคือมีการย้อนกลับของปฏิกิริยาทั้งหมด การเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของเชื้อ anaerobe จะกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อเข้าสู่สภาวะไร้ออกซิเจนอีกครั้ง (Jones and Woods, 1986)

2.1.6.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ในกระบวนการหมัก ค่า pH เป็นตัวกำหนดการย่อยของน้ำตาล ซึ่ง Bahl. *et al.* (1982) ได้กล่าวไว้ว่าในการหมักแบบต่อเนื่องโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ถ้ารักษาระดับค่า pH ของน้ำหมักไว้ที่ค่าประมาณ pH 7 จะทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของการหมักเป็นอะซิเตต บิวทิเรต ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ในทางตรงกันเมื่อค่า pH ต่ำกว่า 5.0 จะสามารถผลิตตัวทำละลายได้เล็กน้อย ซึ่งสามารถเพิ่มอัตราการผลิตได้ด้วยการเติมกรดบิวทิริกลงไปในน้ำหมัก อย่างไรก็ตาม ช่วงของ pH ที่จะทำให้มีการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์จะอยู่ในช่วงกว้างมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาวะของการหมักด้วย ช่วงของการหมักที่มีการสร้างตัวทำละลายมักอยู่ในช่วง pH 3.8 ถึง 5.5 ในขณะที่แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมอย่าง *C. acetobutylicum* P262 สามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีในช่วง pH สูงถึง 6.5 (Jones and Woods, 1986)

กรดอินทรีย์อย่างอ่อน (Weak organic acid) เช่น กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก ถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product) ของปฏิกิริยา โดยธรรมชาติแล้วจะเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ในรูปที่ไม่แตกตัว ที่ความเข้มข้นของกรดสูงๆ ค่า pH ที่ผิวของเยื่อหุ้มเซลล์จะลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุในการยับยั้งปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งหมดของเซลล์ ภายในตัวเซลล์ที่มีความเข้มข้นกรดต่ำกว่า จะมีการสะสมของกรดและการลดลงของค่า pH จึงทำให้อัตราการเจริญลดลงจนหยุดชะงักในที่สุด ถึงแม้ว่าการใช้วัตถุดิบและเมแทบอลิซึมของเซลล์ยังดำเนินต่อไป (Zhu and Yang, 2004) ดังนั้นจึงมีการเสนอว่าจุดสำคัญที่เปลี่ยนระยะการสร้างกรดอินทรีย์ไปเป็นระยะการสร้างตัวทำละลายคือกลไก Detoxification ของเซลล์ เพื่อกำจัดผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากการยับยั้งจากกรด เมื่อกรดที่ถูกสร้างขึ้นในขั้นตอนสุดท้ายมีค่าสูงถึงระดับที่มีพิษ (Hartmanis. *et al.*, 1984; Long. *et al.*, 1984) โดยทั่วไป การเริ่มต้นของระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์เกิดขึ้นร่วมกันขณะที่ pH ของสารอาหารมีค่าต่ำและมีกรดในรูปที่ไม่แตกตัวอยู่ในช่วงวิกฤต (Lee. *et al.*, 2008b) ดังนั้น ความเข้มข้นของบิวทิเรตจะต่ำที่ค่า pH ต่ำ (Jones and Woods, 1986) ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่าผลของ pH เป็นผลจากความเข้มข้นของกรดบิวทิริกที่ไม่แตกตัวและเป็นปัจจัยควบคุมการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์

2.1.6.5 วิตามิน

ไบโอติน (biotin) และกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างอะซิโตนและบิวทานอล ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีอยู่ใน

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือวัตถุที่ประกอบไปด้วยวิตามินที่จำเป็น (essential vitamin) (นวลจันทร์ และสุวิญญา, 2548)

2.1.7 บิวทานอลกับการประยุกต์ใช้

นอกจากมีความสนใจในการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวกับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีอย่างมาก บิวทานอลส่วนใหญ่ถูกทำปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ เช่น Butyl acrylate และ Methacrylate ester ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตกาว สารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสี อนุพันธ์ของบิวทานอลชนิดอื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ Butyl glycol ether Butyl acetate และ Plasticizer เป็นต้น ทั้งนี้ บิวทานอลยังใช้เป็นตัวทำละลายกันอย่างแพร่หลายสำหรับสารเคลือบไม้และวัสดุต่างๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ ใช้เป็นทินเนอร์สำหรับผสมสี (Paint thinner) เป็นตัวทำละลายในสี เช่น หมึกปริ้นท์ และใช้เป็นสารสกัดในกระบวนการผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมน และวิตามิน เป็นต้น นอกจากนี้บิวทานอลยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด รวมไปถึงสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมอาหาร และ อุตสาหกรรมกลิ่นรสได้อีกด้วย (Lee. *et al.*, 2008b; Dürre, 2008)

2.2 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตบิวทานอล

2.2.1 เชื้อ *Clostridium*

แบคทีเรียคลาส Clostridia ประกอบด้วย แบคทีเรีย 3 อันดับ และ 11 วงศ์ สกุล *Clostridium* เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุด (Klein and Harlry, 2002) มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน การเรียงตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงระยะแรก (young culture) เซลล์มีการเรียงตัวเป็นเส้นสายสั้นๆ ที่มีปลายกลมหรือปลายแหลม โดยทั่วไปมักมีรูปร่างไม่แน่นอน (Holt. *et al.*, 1994) สร้างสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (endospore) สปอร์มีรูปร่างกลม จัดเป็น obligate หรือ strict anaerobe มีบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน (aeroterolant) เช่น *C. canis* *C. histolyticum* และ *C. tertium* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ catalase ได้แตกต่างกัน บางสายพันธุ์สร้างได้แต่น้อย (Sneath. *et al.*, 1986) เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สร้างแคปซูล ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) สามารถหมักกลูโคสได้อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้คือ 10 ถึง 65 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 131 ชนิด (MacFaddin, 2000)

Clostridia ที่ผลิตกรดแลกติกและกรดบิวทริกนั้นมีหลายสายพันธุ์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตอะซิโตนและบิวทานอลในการหมักแบบ batch ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมากที่สุดคือ *C. acetobutylicum* ซึ่ง Clostridia นั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดย *C. beijerinckii* (*C. butylicum*) สามารถผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับ *C. acetobutylicum* แต่ *C. beijerinckii* บางสายพันธุ์ผลิตไอโซโพรพานอล (isopropanol) แทนที่การผลิตอะซิโตน ในขณะที่ *C. aurantibutyricum* สามารถผลิตได้ทั้งอะซิโตนและไอโซโพรพานอล นอกเหนือจากการผลิตบิวทานอล (George. *et al.*, 1983)

C. tetanomorphum เป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ สามารถผลิตบิวทานอลและเอทานอลในปริมาณที่เกือบจะเท่ากันและไม่ผลิตสารละลายตัวอื่น (Gottwald. *et al.*, 1984) จากการรายงานสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตอะซิโตนและบิวทานอลเหล่านี้ได้ในดินที่มีการสลายตัวของพืช มันฝรั่ง พืชตระกูลถั่วที่สามารถตรึงไนโตรเจน และรากพืชอื่นๆ เป็นแหล่งที่เหมาะสมต่อการศึกษามาก นอกจากนี้บริเวณที่มีการเพาะปลูกธัญพืช ผลไม้ เช่น กุสเบอรี่ และดินเพาะปลูกทางการเกษตรอาจทำให้เพิ่มความสำเร็จในการค้นพบแบคทีเรียเหล่านี้ได้ (Beesch, 1953; Calam, 1980; McCutchan and Hickey, 1954)

กระบวนการหมักทางอุตสาหกรรมขึ้นอยู่กับ การคัดเลือกสายพันธุ์ วัตถุประสงค์ที่ใช้ อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ สารอาหารที่ต้องการเพิ่มเติม และการทนทานของจุลินทรีย์ (Hastings, 1978; Ross, 1961) ซึ่งลักษณะสายพันธุ์ที่ต้องการอาจได้จากการคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ หรือปรับปรุงสายพันธุ์โดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม

การผลิตอะซิโตนและบิวทานอล โดยใช้แป้งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นนั้น สามารถหมักได้โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* เนื่องจากเชื้อนี้สามารถย่อยแป้งได้ แต่ในกรณีใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นจะนิยมใช้เชื้อ *C. saccharobutylicum* เพราะจะให้ผลได้ดีกว่า

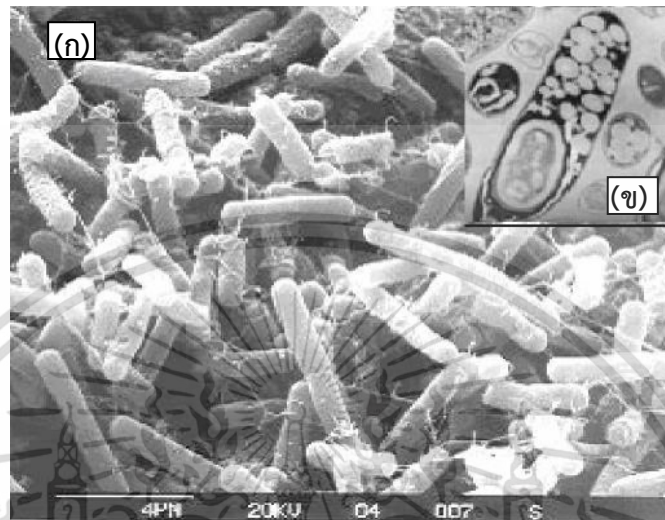
2.2.2 *Clostridium acetobutylicum*

C. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligate anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ก) มีขนาด $0.6-0.9 \times 2.4-4.7 \mu\text{m}$ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบๆ เซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของเอนโดสปอร์ค่อนข้างไปทางปลาย เซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (ข) ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exospore) ไม่มีรยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $3-5 \mu\text{m}$ สีของโคโลนีเป็นสีครีม ผิวเป็นมัน และโปร่งแสง (Jones. *et al.*, 1982)

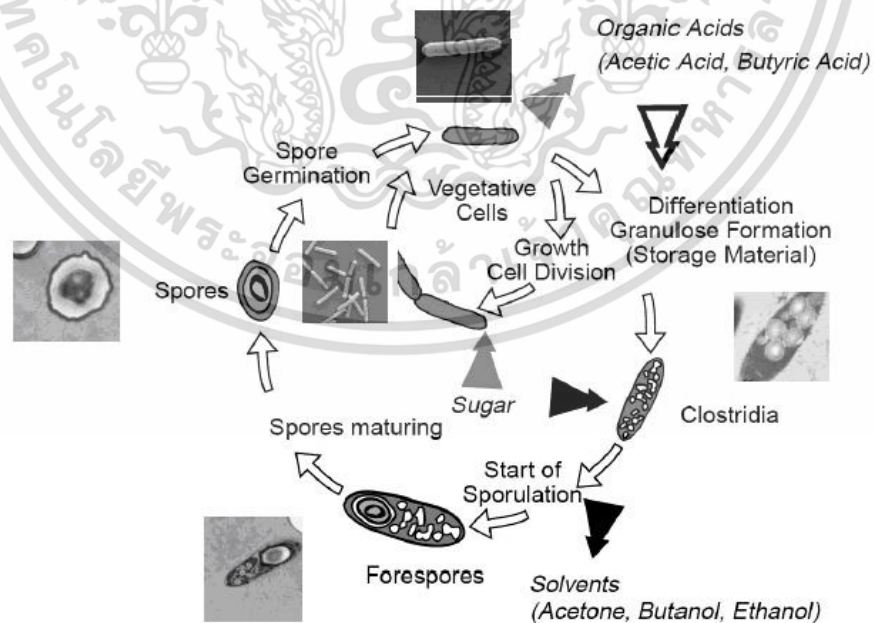
วงจรชีวิตและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สามารถแบ่งได้ 4 ช่วง ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่ต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังรูปที่ 2.4 ได้แก่ (1) การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) พบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods shaped) ซึ่งอาจพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกันเป็นสายโซ่ยาวก็ได้ (2) รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายซิกก้าเรียสา (Cigar shape) การเจริญในขั้นนี้เซลล์จะมีการสร้างสารจำพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการฟองขึ้น (3) Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป (4) รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์ เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Schuster. *et al.*, 1998)



รูปที่ 2.3 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM): (ก) เซลล์ปกติ (Vegetative cells); (ข) สปอร์ (Spore formed cells) (Jones. *et al.*, 1982)



รูปที่ 2.4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* (Schuster. *et al.*, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 *Clostridium beijerinckii*

ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 คือเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายน้ำตาลได้ (saccharolytic bacteria) ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strictly anaerobic) เจริญได้ดีในอุณหภูมิ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ มีรูปร่างเป็นท่อน และสปอร์อยู่ก่อนมาปลายเซลล์ (sub-terminal spores) ในระหว่างกระบวนการหมัก *C. beijerinckii* NCIMB 8052 จะผลิตอะซิเตต บิวทิเรต แลคเตต ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล อะซิโตนิน (acetoin) และอะซิติลเมทิลคาร์บอนิล (acetyl methyl carbonyl) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงในช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยในระยะ early exponential phase เซลล์จะมีลักษณะเป็นเส้นสายและมีการเคลื่อนที่อย่างมาก ส่วนในระยะผลิตตัวทำละลายจะคล้ายกันระยะ stationary phase คือเซลล์มีรูปร่างสั้นลง ขนาดใหญ่ขึ้นและมีการเคลื่อนที่ลดลง (Jones and Woods, 1986) สามารถพบ *C. beijerinckii* ได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมักแยกได้จากตัวอย่างดิน (O'Brien and Morris, 1971)

C. beijerinckii NCIMB 8052 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอล อะซิโตน และ/หรือไอโซโพรพานอลได้อย่างดี และสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลาย เช่น น้ำตาล เพนโตส น้ำตาลเฮกโซส และแป้ง เป็นต้น ซึ่งเชื้อสามารถผลิตตัวทำละลายได้อย่างต่อเนื่องในช่วงเข้าสู่ระยะ log-phase มีความเสถียร และสามารถปรับตัวได้ดีในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง (continuous processes) จากการศึกษาของโรงงานต้นแบบในการผลิตตัวทำละลาย โดย *C. beijerinckii* BA101 ได้รับการยอมรับว่าสามารถเจริญเติบโตและย่อยสารตั้งต้นได้ดี เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม โดยที่ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 ได้รับการปรับปรุงพันธุกรรมจาก *C. beijerinckii* BA101 ซึ่งมีการผลิตตัวทำละลายที่โดดเด่นในช่วงหลังจากการกลายพันธุ์ทำให้ศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายของ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 ได้ดีขึ้น (Annous and Blaschek, 1991)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทป์ของ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 โดยการประยุกต์ใช้วิธี DNA microarrays เพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของยีนและการเปรียบเทียบจีโนมิกส์ (genomics) เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง *C. beijerinckii* NCIMB 8052 กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ย่อยน้ำตาลได้ดี (saccharolytic bacteria) เช่น *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งการจัดจำแนกนี้ทำให้ง่ายต่อการเลือกใช้จุลินทรีย์ในการย่อยสารตั้งต้นและการผลิตตัวทำละลาย เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก

2.3 แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน

2.3.1 การจำแนกแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Identification of Anaerobic Bacteria)

Obligate anaerobic คือแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งขณะบ่มในบรรยากาศห้องหรือบ่มที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (CO₂ incubator) แต่เจริญได้ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนเท่านั้น คำจำกัดความที่จัดแบ่งตามความสัมพันธ์ของการเจริญของแบคทีเรียกับออกซิเจน มีดังนี้ (นันทนา, 2549; อัญชลี, 2548)

- Aerobic bacteria หมายถึงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต โดยใช้ ออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้าย

- Obligate aerobe หมายถึงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต และไม่สามารถเจริญในที่ไร้ออกซิเจน

- Anaerobic bacteria หมายถึงเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่อาศัยพลังงานจากการหมัก (fermentation) ซึ่งเชื้อจะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยหรือมี Oxidation-reduction potential (EH) ต่ำ ถ้าในที่ที่มีออกซิเจนสูง เชื้อจะเจริญได้ไม่ดีหรือไม่เจริญเลย

- Facultative anaerobe หมายถึงเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้ ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แต่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน เชื้อจะได้พลังงานจากปฏิกิริยาการหมัก

- Aerotolerant anaerobes หมายถึงเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตแต่สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้

- Microaerophile bacteria หมายถึงแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนปริมาณน้อยๆ 2 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีออกซิเจนน้อยกว่าหรือมากเกินไปเชื้อจะไม่เจริญ จึงมักพบการเจริญที่ระดับต่ำกว่าผิวหน้าของอาหารเหลว

สำหรับ obligate aerobe ต้องการออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ได้ผลผลิตเป็นน้ำ ไม่จำเป็นต้องได้พลังงานจากการหมัก

ในขณะที่ obligate anaerobe สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม จากความสามารถในการทนต่อออกซิเจน กลุ่มแรกคือ strictly obligate anaerobe ไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณออกซิเจนในสภาวะปกติเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *C. haemolyticum*, *C. novyi* B, *Selenomonas ruminatum* และ *Treponema denticola* ซึ่งส่วนใหญ่มักไม่ก่อโรคในมนุษย์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ moderately obligate anaerobe เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีออกซิเจน 2 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ยประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์) (นันทนา, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็น aerotolerant สามารถเจริญในอากาศได้บ้าง หรือเจริญเติบโตได้ที่ CO₂ incubator 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงอาจมีความสับสนเมื่อแยกเชื้อระหว่าง *Bacillus* กับ *Clostridium* ซึ่ง *Clostridium* จะสร้างสปอร์ในสภาวะไร้ออกซิเจน สำหรับกลุ่มที่เป็น aerotolerant ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ catalase เช่นเดียวกับ *Bacillus* แต่โคโลนีของ *Clostridium* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจนมีขนาดใหญ่กว่าโคโลนีในกลุ่มของ *Bacillus* ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ไม่สร้างสปอร์ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน สำหรับสปอร์ของ *Clostridium* บางครั้งจะบวมมีหนาม หรือมีลักษณะเหมือนไม้ตีกอง ไม้เทนนิส บางชนิดสปอร์อาจอยู่กลางเซลล์ (central) บางชนิดอยู่ปลายเซลล์ (terminal) หรือบางชนิดสปอร์อยู่ก่อนไปทางปลายเซลล์ (subterminal) สำหรับ obligate (strict) anaerobes ไม่ผลิตเอนไซม์ catalase และ cytochrome oxidase ทำให้ไม่สามารถใช้ออกซิเจนในการรับอิเล็กตรอนในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน หรือขาดเอนไซม์ superoxide dismutase ทำให้มีการสะสมของ superoxide anion และ peroxide anion เกิดขึ้น การเพาะเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องเลี้ยงในสภาวะที่มีค่า Eh ต่ำ เช่น thiglycolate medium, cooked meat medium หรือเพาะเลี้ยงใน anaerobic incubater หรือ anaerobic jar ที่มีการดึงออกซิเจนออก

2.3.2 ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของ Anaerobic Bacteria

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของ anaerobe มีเพียง 2 ข้อ คือ ผลกระทบจากบรรยากาศที่มีออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน และค่า Oxidation-reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

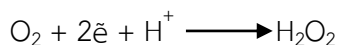
2.3.2.1 Oxygen Tolerance

ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มแอโรบหรือ facultative anaerobic เผชิญกับออกซิเจนในอากาศ ผลที่เกิดขึ้นคือ reduced flavoprotein หรือ reduced iron-sulfur protein จะรวมกับออกซิเจน และมีการทำงานของเอนไซม์ oxidase ทำให้ได้ผลผลิตเป็น superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) ดังสมการ นอกจากนี้ superoxide anion และ H₂O₂ อาจทำปฏิกิริยากันทำให้ได้ hydroxyl radical (OH⁻) ซึ่งมีสมบัติเป็นตัว oxidant อย่างรุนแรงและอาจมี single oxygen (O₂⁻) ซึ่งเป็นสารพิษเกิดขึ้น (Gregory. *et al.*, 1977)



Flavoprotein Reduce flavoprotein

oxidase



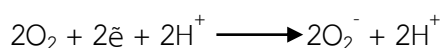
หรือ



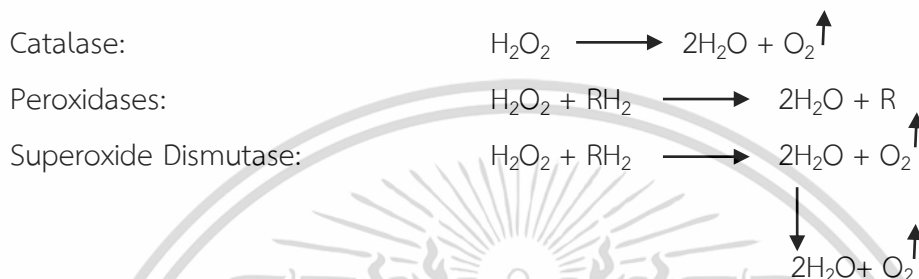
Flavoprotein Reduce flavoprotein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

oxidase



แบคทีเรียบางชนิดในกลุ่ม strictly obligate anaerobe จะถูกทำลายขณะบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน นานอย่างน้อย 10 นาที ขณะที่ moderately obligate anaerobe นั้นทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนนานกว่า เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase เอนไซม์ catalase และ peroxidase เพื่อทำลายผลผลิต โดยเปลี่ยน H_2O และ O_2 (Fridovich, 1978) ดังสมการต่อไปนี้



แบคทีเรียกลุ่ม anaerobe และ facultative anaerobe หรือ aerotolerant ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ catalase และ SOD ยกตัวอย่างเช่น สมาชิกของ *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis* ยกเว้น *Streptococcus* spp. ที่ขาดเอนไซม์ catalase สำหรับ obligate (strict) anaerobe ขาดเอนไซม์ทั้งสองชนิด สำหรับแบคทีเรีย anaerobe เช่น *Clostridium* spp. ผลิตเอนไซม์ peroxidase และ catalase

2.3.2.2 Oxidation-Reduction Potential (“Redox” Potential or Eh)

ค่า Eh ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีหน่วยเป็นโวลต์หรือมิลลิโวลต์ วัดได้โดยใช้ platinum wire electrode พร้อมกับ standard reference electrode ต่อเข้ากับ pH meter ค่า redox potential ที่ pH 7 จะเป็นค่า Eh' การใช้ reducing agent เช่น thioglycollate และ L-cysteine ผสมใน anaerobic transport media และอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ เพื่อให้อาหารอยู่ในสภาพที่ถูกรีดิวซ์ ค่า Eh เป็นบวก (สังเกตจากอินดิเคเตอร์ resazurin เปลี่ยนเป็นสีชมพูหรืออินดิเคเตอร์ methylene blue เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน) แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อถูกออกซิไดซ์ในธรรมชาติ ค่า Eh สูงสุดมีค่า +820 mV (Collee. *et al.*, 1989)

anaerobe ส่วนใหญ่ไม่เจริญในสภาวะที่มีค่า Eh สูงกว่าค่า Eh ที่กำหนด และบางชนิดเจริญเติบโตในที่ที่มีอากาศได้ ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า Eh ต่ำเพียงพอ Walden and Hentges (1975) ได้ศึกษาผลกระทบของ Eh และ O_2 ต่อการเจริญของ *C. perfringens*, *B. fragilis* และ *P. magnus* พบว่าออกซิเจนยับยั้งการเจริญเติบโตของ anaerobe เหล่านี้ ขณะบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า Eh -50 mV (โดยผสม thioglycollic acid หรือ cysteine hydrochloride หรือ dithiothreitol เป็นตัวรีดิวซ์) และไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า Eh +500 mV ในสภาวะที่มีอากาศ และสำหรับการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนถึงแม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีค่า Eh สูงถึง +325 mV (โดยผสม potassium ferric cyanide เป็นตัวออกซิไดซ์) จากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการบ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงสารพิษที่เกิดจากการออกซิไดซ์มีความสำคัญมากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเชื้อที่มีค่า Eh ต่ำ ดังนั้นหลักการสำคัญในการเพาะเลี้ยงเชื้อ anaerobe ให้ประสบความสำเร็จต้องหลีกเลี่ยงสภาวะที่มีออกซิเจนให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ เช่น บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อใน anaerobic jar การใช้ glove box หรือ anaerobic chamber เป็นต้น

2.3.3 เทคนิคการบ่มเพาะเชื้อ

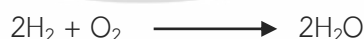
การเจริญของแบคทีเรีย anaerobe สัมพันธ์กับ Eh potential ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอยู่ในสภาวะรีดิวซ์สูง ค่า Eh potential จะมีค่าลบ แต่ถ้าในสภาวะออกซิไดซ์สูงค่าจะเป็นบวก ซึ่ง anaerobe จะเจริญได้ดีก็ต่อเมื่อกำจัดออกซิเจนออกไปจากสิ่งแวดล้อมนั้น หรือทำให้สิ่งแวดล้อมนั้นมีค่า Eh ต่ำ เช่น การเติมสาร reducing agent ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ หรือไล่ออกซิเจนออกจากอาหารเหลว วิธีการต่างๆ ที่นิยมใช้มีดังนี้ (นันทนา, 2549; อัญชลี, 2548)

2.3.4.1 การใช้สาร reducing agent

สาร reducing agent เช่น sodium thioglycollate, cysteine ผสมกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาวะรีดิวซ์ และปิดทับด้วย paraffin oil เพื่อเป็นการป้องกันเชื้อต่อการสัมผัสกับออกซิเจนอีกชั้นหนึ่ง (อัญชลี, 2548)

2.3.4.2 Anaerobic Jar Techniques

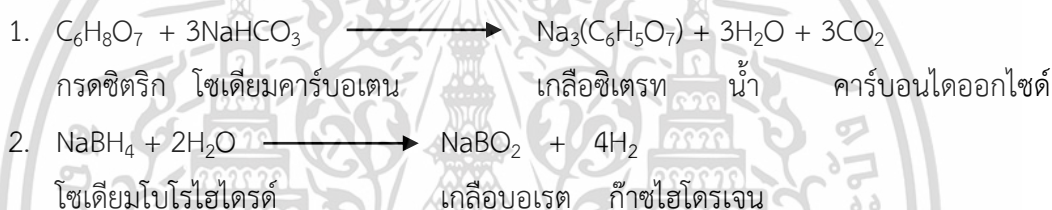
ปัจจุบัน anaerobic jar เป็นภาชนะทรงกลม อาจทำด้วยโลหะ พลาสติก หรือแก้วมีฝาปิดสนิท ใช้ในการเพาะแยกเชื้อ anaerobe มีหลากหลายแบบด้วยกัน เช่น Brewer, Baird-Tatlock, GasPak, McIntosh-Fildes, Oxoid, Scott Laboratories และ Torbal jar สำหรับ GasPak jar เป็นที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปเพราะไม่ยุ่งยาก เสียค่าใช้จ่ายต่ำและได้ผลดี ในขณะที่ Oxoid jar มีฝาปิดเป็นโลหะ มี Schraader valve มีเครื่องวัดความดัน หลักการคือดึงออกซิเจนออกจากถังโดยออกซิเจนทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนขณะมีคาตาลิสต์อยู่ด้วย ทำให้ออกซิเจนเปลี่ยนรูปเป็นน้ำ ดังสมการ



การใช้คาตาลิสต์ในระบบ anaerobic jar เป็นสิ่งที่สำคัญมาก สำหรับ Brewer jar ใช้ palladium เป็นตัวคาตาลิสต์ใสในของถัง (modified McIntosh-Fildes jar) ซึ่งต้องให้ความร้อนด้วยกระแสไฟฟ้า จึงจะเป็นตัวคาตาลิสต์ที่สมบูรณ์แบบได้ สำหรับ GasPak jar ใช้ “cold” catalyst ที่ประกอบด้วย palladium-coated alumina pellets ซึ่งไม่ต้องการให้ความร้อนเร่งปฏิกิริยา ทำให้สะดวกกว่าและไม่มีภาระระเบิดเกิดขึ้น แต่คาตาลิสต์ชนิดนี้อาจจะไม่ทำงานได้ถ้าในภาชนะมีแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือสารระเหยอื่นๆ ตัวคาตาลิสต์ที่เสื่อมสภาพอาจนำมาให้ความร้อนโดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การอบที่อุณหภูมิ 160 ถึง 170 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บในภาชนะที่สะอาดที่อุณหภูมิห้อง หรือใส่ในโถดูดความชื้น (dessicator) จนกว่าจะใช้งานก็สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้การใช้อ่างต้องระมัดระวังอุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น ไม่ควรจุดไฟใกล้ถังก๊าซไฮโดรเจน และควรตรวจว่ามีรอยรั่วหรือไม่

การเตรียมสภาพถังหมักให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนสามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่ทำได้คือใช้ hydrogen-carbon dioxide generator ส่วนอีกวิธีเป็นการเป็นการแทนที่อากาศด้วย N₂ 85 เปอร์เซ็นต์ H₂ 10 เปอร์เซ็นต์ และ CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้ gas generator และทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแอนแอโรบได้รวดเร็วกว่า ส่วนแบบที่ไม่ต้องมีถังผสมคือ GasPac jar (GasPac Anaerobic Jar, BBL, Cockeysville, MD) เมื่อใส่อาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อในถังแล้ว พร้อมกับใส่ช่องที่ผลิตก๊าซ H₂ และ CO₂ ตัดมุมของผลิตภัณฑ์ออก แล้วใช้ปิเปตต์ดูดน้ำ 10 มิลลิลิตร ใส่ในช่อง จากนั้นทำการปิดฝาถังให้สนิท ก๊าซไฮโดรเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะผลิตขึ้นในถัง จากปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



ถ้าไม่มีการผลิตก๊าซภายใน 25 นาที ควรเปิดถังและนำช่องที่ผลิตก๊าซไปทิ้ง ความผิดพลาดนี้อาจเกิดจากการช่องบรรจุขาดทำให้เกิดการเล็ดลอดของก๊าซเข้าช่อง หรือคาตาไลสต์เสื่อมคุณภาพก็ได้ การตรวจสอบสภาพปราศจากออกซิเจนทำได้โดยการวางแผ่น Methylene blue (BBL Microbiology systems, Cockeysville, MD) หรือหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายผสมของ methylene blue-NaHCO₃-glucose ลงในถัง ซึ่ง methylene blue จะมีสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในสภาพถูกออกซิไดซ์และจะมีสีขาวเมื่ออยู่ในสภาพถูกรีดิวซ์ อินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนเป็นสีขาวและจะยังคงสภาพเป็นสีขาวต่อไป ถ้าหากอินดิเคเตอร์เปลี่ยนกลับมาเป็นสีน้ำเงินอีกแสดงว่าสภาพปราศจากออกซิเจนไม่ได้เกิดขึ้น ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้ออาจไม่ได้ผล (นันทนา, 2549)

2.3.4.3 Anaerobic Glove Box Techniques

เป็นตู้สำหรับการแยกและจำแนกชนิดของ anaerobe โดยไม่สัมผัสกับอากาศเลย จึงเพาะเลี้ยงเชื้อได้มาก เหมาะกับห้องปฏิบัติการใหญ่ๆ ที่มีการเพาะแยกเชื้อ anaerobe เป็นจำนวนมาก ราคาของอุปกรณ์ค่อนข้างแพง ตู้บ่มเชื้อมีถุงมือสามารถยื่นเข้าไปในตู้เพื่อให้ผู้ปฏิบัติงานสอดมือเข้าไปปฏิบัติงานได้ จึงเหมาะสำหรับการเพาะแยกเชื้อ strict anaerobe ในขณะที่ใช้เครื่องมือจะมีก๊าซไนโตรเจนและก๊าซผสมของไนโตรเจน ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์แทนที่อากาศในตู้ (นันทนา, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ความหลากหลายของ *Clostridium*

แบคทีเรีย *Clostridium* เป็นสกุลใหญ่สกุลหนึ่งของ prokaryotes ซึ่งขณะนี้มากกว่า 200 สายพันธุ์ เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน รูปร่างเป็นท่อน (Euzeby, 2014) และสามารถสร้างสปอร์ได้ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ *Clostridium* ส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก แต่ก็ถูกค้นพบว่าบางสายพันธุ์มีผนังเซลล์เป็นแกรมลบ (Cato. *et al.*, 1986) ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 23S rRNA นั้นไม่สามารถแยก Clostridia แกรมบวกและแกรมลบได้อย่างชัดเจน (Johnson and Francis, 1975) แต่อย่างไรก็ตาม Collins. *et al.* (1994) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA ของ *Clostridium* แสดงให้เห็นว่ามีมากกว่า 30 สายพันธุ์ ที่จัดอยู่ในกลุ่ม (cluster) เดียวกัน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* จึงมีผู้ให้ความสนใจและทำการศึกษากันมากขึ้น โดยแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ จึงพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น แหล่งที่มีการย่อยสลายทางชีวภาพ ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ น้ำเสีย ดิน และตะกอนดินในแหล่งน้ำ (Miwa, 1975; Borneman and Triplett, 1997) จากความก้าวหน้าทางด้านอนุวิทยาได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยทำการวิเคราะห์ลักษณะที่มีการแสดงออก (Phenotypic) ร่วมกับลักษณะความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic) จากลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA ซึ่ง Woese (1987) ได้กล่าวไว้ว่าในยุคแรกนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 5S rRNA แต่เนื่องจากมีความจำกัดทางข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบและขนาดของลำดับนิวคลีโอไทป์ ภายหลังจึงปรับเปลี่ยนมาศึกษาบริเวณ 16S rRNA ในการวิเคราะห์ เนื่องจากยีนส่วน 16S rRNA นั้น สามารถพบได้ในแบคทีเรียทุกชนิด และยีนดังกล่าวเป็นยีนโครงสร้าง (Structural gene) โดยที่ยีนนี้จะถูกถอดรหัสไปเป็น 16S rRNA ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไรโบโซมในแบคทีเรียทุกชนิด และยังไม่มีการค้นพบการถ่ายยีนในโมเลกุลของ rRNA ดังนั้นจึงคาดว่าน่าจะนำมาศึกษาในการสร้าง Phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตได้ อีกทั้งบางตำแหน่งของยีน 16S rRNA มีการอนุรักษ์ยีนไว้ แม้ว่าจะเกิดการวิวัฒนาการก็ตาม

2.4.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการจัดจำแนก (Phylogenetic and taxonomic)

Clostridiaceae เป็นวงศ์แรก (Family I) ใน 19 วงศ์ที่อยู่ในลำดับ (Order I) *Clostridiales* ของกลุ่ม (Class) *Clostridia* ในไฟลัม (Phylum) *Firmicutes* ซึ่งแบ่งได้เป็น 13 สกุล (genus) (Prévot, 1953) ข้อมูลแสดงดังนี้

Class II “Clostridia”

Order I *Clostridiales*

Family I *Clostridiaceae*

Genus I *Clostridium*

Genus II *Alkaliphilus*

Genus III *Anaerobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genus IV *Anoxytrichum*

Genus V *Caloramator*

Genus VI *Caloranaerobacter*

Genus VII *Caminicella*

Genus VIII *Natronincola*

Genus IX *Oxobacter*

Genus X *Sarcina*

Genus XI *Thermobrachium*

Genus XII *Thermohalobacter*

Genus XIII *Tindallia*

Euzéby (1997) ได้กล่าวไว้ว่าได้มีการจัดจำแนกเชื้อ *Anaerobacter polyendosporus* ในสกุล *Anaerobacter* ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในสกุลของ *Clostridium* เป็น *C. polyendosporum* และจัดจำแนกให้ *Thermobrachium celere* ในสกุล *Thermobrachium* จัดเป็น *Caloramator celer* อยู่ในสกุล *Caloramator* ดังนั้นจึงจัดจำแนกได้เพียง 11 สกุล และสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักกันใน *Clostridiaceae* มีทั้งหมดประมาณ 190 สายพันธุ์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Collins. *et al.* (1994) และการอภิปรายของ Wiegel. *et al.* (2006) ได้กล่าวไว้ว่าอาจมีสายพันธุ์มากกว่าครึ่งหนึ่งที่มีชื่ออยู่ใน *Clostridial* แต่ไม่ได้อยู่ในสกุล *Clostridium sensu stricto* (Collins' Group I) และควรที่จะได้รับการแต่งตั้งให้เป็นสกุลและวงศ์ใหม่ ซึ่งในปัจจุบันมีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยยีน 16S rRNA เป็นอย่างมาก เพื่อแก้ไขปัญหาบางประการในการระบุสายพันธุ์ที่ยังไม่ได้กำหนดไว้ในสกุล *Clostridium* โดยก่อนหน้านี้หลายทศวรรษก่อนที่จะมีการวิเคราะห์โดยยีน 16S rRNA ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณ G+C ของ DNA (22–55 mol%) และความแปรปรวนของการสร้างสปอร์และการย้อมสีแกรม ดังนั้น *Clostridium* หลายสายพันธุ์ที่ไม่ได้จัดอยู่ในสกุลของ *Clostridium sensu stricto* จึงถูกจัดจำแนกไปอยู่ในสกุลและวงศ์อื่น และอาจจัดอยู่ในลำดับที่ต่างกัน ยกตัวอย่างสายพันธุ์ที่ถูกจัดจำแนกใหม่ เช่น *C. thermosaccharolyticum* ถูกจัดจำแนกเป็นสกุล *Thermoanaerobacterium* (Lee. *et al.*, 1993) และ *C. thermoaceticum* ถูกจัดจำแนกเป็นสกุล *Moorella* ซึ่งทั้งสองจัดอยู่ในวงศ์ *Thermoanaerobacteraceae* (Collins. *et al.*, 1994; Ludwig. *et al.*, 2009; Stackebrandt. *et al.*, 1999a; Stackebrandt and Rainey, 1997)

Clostridium sensu stricto (Collins. *et al.*, 1994) เป็นแบคทีเรียชนิด obligately anaerobic สามารถสร้างสปอร์ได้ มีรูปร่างเป็นแท่ง และมีค่า G+C ของ DNA ประมาณ 22–35 mol% ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็น mesophilic ย้อมติดสีแกรมบวก และที่ผนังเซลล์มีกรด mesodiaminopimelic ยกเว้น *C. thermobutyricum* ที่ย้อมติดสีแกรมลบ (Wiegel. *et al.*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1989) แต่เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ซัลเฟต (sulfate) ดังนั้นคุณสมบัติส่วนใหญ่ยังคงสอดคล้องกับคำจำกัดความของ *Clostridium* ตามที่กำหนดโดย Hippe. *et al.* (1992) อย่างไรก็ตาม หลายสกุล ในวงศ์ *Clostridiaceae* มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น บางสายพันธุ์ไม่สร้างสปอร์ (แต่มียีนที่สามารถสร้างสปอร์ได้) หรือไม่สร้างสปอร์ หรือไม่มียีนสร้างสปอร์ (Brill and Wiegel, 1997; Onyenwoke. *et al.*, 2004) บางชนิดโดยเฉพาะในลำดับ (Order) thermophilic (thermophilic taxa) เช่น *C. thermocellum* เป็นแกรมลบในทุกระยะของการเจริญเติบโตถึงแม้ว่าผนังเซลล์จะเป็นประเภทแกรมบวกที่ไม่มี lipopolysaccharide (Wiegel, 1981)

Clostridiaceae สามารถคัดแยกได้ทั่วไปตามอุณหภูมิและกึ่งมูล ตะกอนน้ำเสีย ตะกอนน้ำจืดและทะเล ทะเลสาบเกลือ และส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีถิ่นอาศัยแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับกับอุณหภูมิและปัจจัยอื่นๆ เช่น ชั้นดินเยือกแข็ง (permafrost) แหล่งอุณหภูมิตัวไปตามธรรมชาติ (mesobiotic) และแหล่งที่มีความร้อน เนื่องจากหลายสายพันธุ์ของ *Clostridiaceae* มีสปอร์ที่สามารถทนความแห้งและความร้อนได้จึงสามารถค้นพบได้หลากหลายสถานที่ อย่างไรก็ตามบางสายพันธุ์พบได้เฉพาะแหล่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้สูงซึ่งอยู่ในสกุล *Clostridium sensu stricto* ตลอดจนสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางชีวภาพที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้ เช่น *C. acetobutylicum* เป็นต้น (Vos. *et al.*, 2009)

2.4.2 อนุกรมวิธาน (Taxonomy)

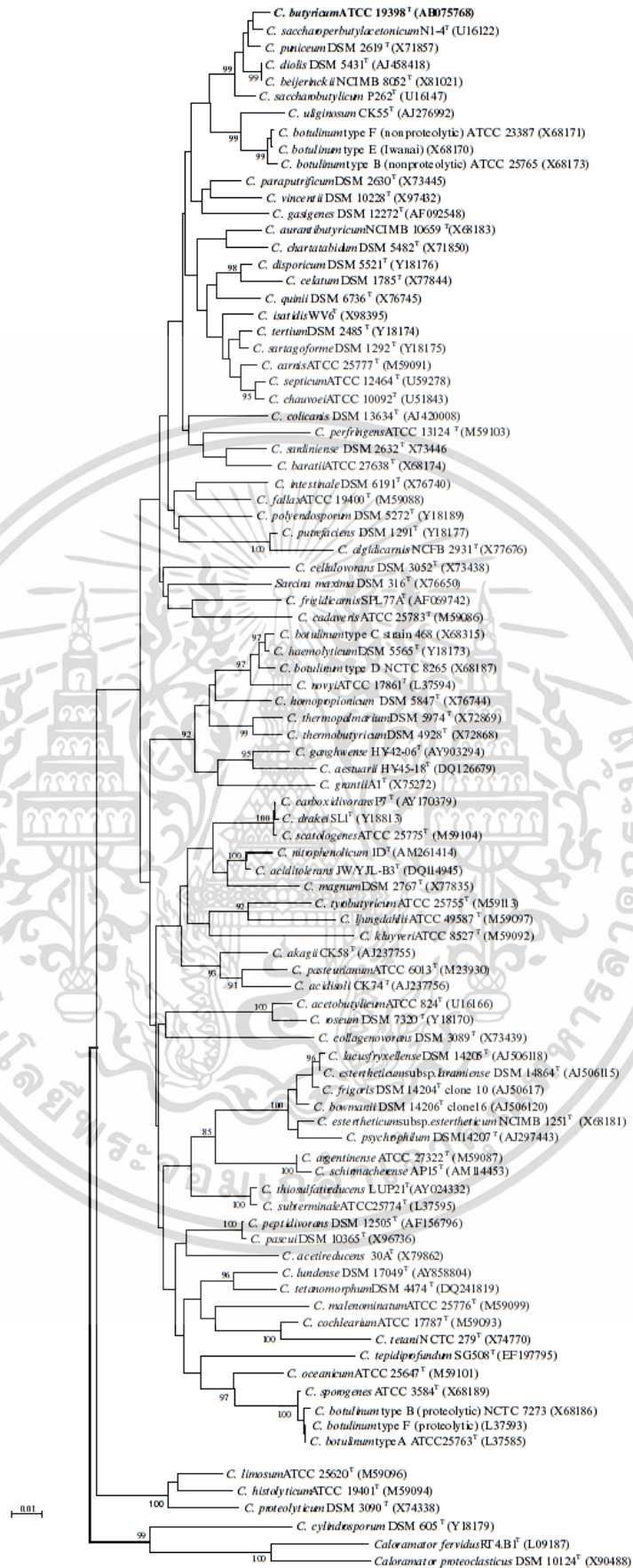
เชื้อในสกุล (genus) *Clostridium* ที่ได้รับการตีพิมพ์อย่างถูกต้องมีประมาณ 168 สายพันธุ์ ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA พบ 77 สายพันธุ์จัดอยู่ cluster I ของ *Clostridia* ตามที่กำหนดโดย Collins. *et al.* (1994) แสดงดังตารางที่ 2.4 ส่วนที่เหลืออีก 91 สายพันธุ์ไม่ได้จัดอยู่ใน cluster I (*Clostridium sensu stricto*) เช่น *C. histolyticum*, *C. limosum* และ *C. proteolyticum* ซึ่งจัดอยู่ใน cluster II โดยความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์ที่อยู่ใน cluster I และ cluster II ของ *Clostridia* แสดงไว้ในรูปที่ 2.5 (Collins. *et al.*, 1994; Rainey. *et al.*, 1993; Stackebrandt. *et al.*, 1999; Wiegel. *et al.*, 2006)

ตารางที่ 2.4 สายพันธุ์ *Clostridium* ที่จัดจำแนกอยู่ใน cluster I และเป็นตัวแทนของสกุล (genus)

Clostridium sensu stricto (Collins. et al., 1994)

<i>C. butyricum</i>	<i>C. kluveri</i>
<i>C. acetireducans</i>	<i>C. lacusfryxellense</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. ljungdahlii</i>
<i>C. acidisoli</i>	<i>C. lundense</i>
<i>C. aciditolerans</i>	<i>C. magnum</i>
<i>C. aestuarii</i>	<i>C. malenominatum</i>
<i>C. akagii</i>	<i>C. nitrophenolicum</i>
<i>C. algidicarnis</i>	<i>C. novyi</i>
<i>C. argentinense</i>	<i>C. oceanicum</i>
<i>C. aurantibutyricum</i>	<i>C. paraputrificum</i>
<i>C. baratii</i>	<i>C. pascui</i>
<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. pasteurianum</i>
<i>C. botulinum</i>	<i>C. peptidivorans</i>
<i>C. bowmanii</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>C. cadaveris</i>	<i>C. polyendosporum</i>
<i>C. carboxidivorans</i>	<i>C. psychrophilum</i>
<i>C. carnis</i>	<i>C. puniceum</i>
<i>C. celatum</i>	<i>C. putrefaciens</i>
<i>C. cellulovorans</i>	<i>C. quinii</i>
<i>C. chartatabidum</i>	<i>C. roseum</i>
<i>C. chauvoei</i>	<i>C. saccharobutylicum</i>
<i>C. cochlearium</i>	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>C. colicanis</i>	<i>C. sardinense</i>
<i>C. collagenovorans</i>	<i>C. sartagoforme</i>
<i>C. diolis</i>	<i>C. scatologenes</i>
<i>C. disporicum</i>	<i>C. schirmacherense</i>
<i>C. drakei</i>	<i>C. septicum</i>
<i>C. estertheticum</i> sub sp. <i>estertheticum</i>	<i>C. sporogenes</i>
<i>C. estertheticum</i> sub sp. <i>laramiense</i>	<i>C. subterminale</i>
<i>C. fallax</i>	<i>C. tepidiprofundum</i>
<i>C. frigidicarnis</i>	<i>C. tertium</i>
<i>C. frigoris</i>	<i>C. tetani</i>
<i>C. ganghwense</i>	<i>C. tetanomorphum</i>
<i>C. gasigenes</i>	<i>C. thermobutyricum</i>
<i>C. granti</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
<i>C. hemolyticum</i>	<i>C. thiosulfatireducens</i>
<i>C. homopropionicum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
<i>C. intestinale</i>	<i>C. uliginosum</i>
<i>C. isatidis</i>	<i>C. vincentii</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แผนภูมิความสัมพันธ์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย clusters I และ II ในสกุล *Clostridium* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยนักวิจัยที่ทำงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การใช้โปรแกรมสารสนเทศในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เป็นการบ่งบอกถึงทางวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตหรือสปีชีส์นั้นๆ ในปัจจุบันนิยมนำสายดีเอ็นเอมาวิเคราะห์สร้างข้อมูลแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ของสิ่งมีชีวิต การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเชิงโมเลกุลนั้นประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน กล่าวคือเริ่มต้นจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ และจัดเรียงข้อมูลของสายดีเอ็นเอเพื่อสร้างแบบจำลอง จากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการสร้างแผนภูมิทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และวิเคราะห์แผนภูมิที่ได้ ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) ยกตัวอย่างเช่น DNASIS และ GENETYX สำหรับการจัดการข้อมูลทั่วไปการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันผ่านฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ตด้วยการ BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) ส่วนโปรแกรมในการทำ Alignment ได้แก่ BioEdit, ClustalW, ClustalX, DNASIS และ GENETYX และวิธีการวิเคราะห์การคำนวณ Algorithms ได้แก่ Distance matrix เช่น UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages), ME (Minimum evolution) และ NJ (Neighbor-joining) ตัวอย่างโปรแกรมการคำนวณ ได้แก่ MEGA, DNASIS, GENETYX, PHYLIP และ PAUP เป็นต้น (ปริชา, 2543; Durbin. *et al.*, 1990; Gibas and Jamebeck, 2001)

2.5 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรีย

ภายหลังการแยกเชื้อแบคทีเรียให้ได้สายพันธุ์เดี่ยวที่บริสุทธิ์ไม่มีสายพันธุ์อื่นเจือปนแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใดเชื้อสายใด โดยเริ่มต้นจากการดูลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่าง ลักษณะเซลล์ ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกสายพันธุ์ (species) ของแบคทีเรียให้แน่ชัด โดยอาศัยคุณสมบัติเฉพาะในการสร้างเอนไซม์และเมแทบอลิซึมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งการทดสอบพื้นฐานโดยทั่วไป สามารถแบ่งการทดสอบคุณสมบัติการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

2.5.1 การใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียต้องการสารอาหารที่ประกอบด้วยคาร์บอน ออกซิเจน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ที่แบคทีเรียนำไปประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นโมเลกุลที่มาประกอบเป็นส่วนต่างๆ ของเซลล์ สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ตามคุณสมบัติหรือความสามารถในการใช้สารอาหารประเภทต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ การทดสอบการใช้น้ำตาลหรือสารอินทรีย์อื่นๆ เพื่อการเจริญเติบโตจึงเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่นำมาใช้เพื่อจำแนกได้ (อรษา และเฟื่องฟ้า, 2548)

2.5.1.1 การหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ (carbohydrate fermentation test)

แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเอนไซม์ที่มีอยู่ในแบคทีเรานั้นๆ แบคทีเรียบางชนิดสามารถหมักน้ำตาล เช่น กลูโคส ได้ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobically) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดหรือสารละลายต่างๆ รวมทั้งก๊าซ โดยในการทดสอบจึงใช้ pH indicator ผสมในอาหารที่ใช้ทดสอบเพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง เช่น อาหารทดสอบที่มีฟีนอลเรดเป็น pH indicator เป็นการทดสอบการหมักย่อยกลูโคสแล้วได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรด เช่น แลคติก ซัคซินิก อะซิติก และฟอร์มิก ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 4.2 ซึ่งจะเปลี่ยนสีของอาหารจากสีส้มเป็นสีเหลืองในสภาวะที่เป็นกรด และจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูในสภาวะที่เป็นด่าง การทดสอบการหมักน้ำตาลหากมีก๊าซเกิดขึ้นจะพบก๊าซในอาหารหรือช่องว่างในหลอด Durham ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้ต่างกันทำให้ได้ผลผลิตสุดท้ายจากการย่อยแตกต่างกันซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะของแบคทีเรียที่นำมาจำแนกเชื้อได้ (Cappuccino and Sherman, 2001)

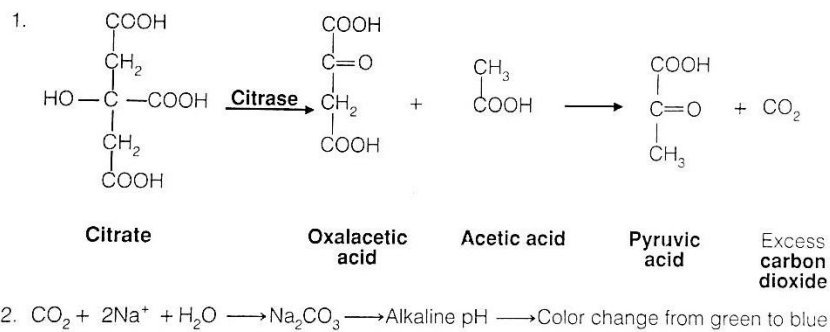
2.5.1.2 Triple Sugar-Iron (TSI) agar test

เป็นการทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล 3 ชนิด คือกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ แลคโตส 1 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมในอาหารทดสอบ แบคทีเรียที่ใช้ได้เฉพาะกลูโคสซึ่งมีอยู่ในอาหารปริมาณน้อยจึงให้ผลผลิตกรดได้น้อย และต้องใช้กรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้นแทนทำให้ได้แอมโมเนีย (ด่าง) เป็นผลผลิตสุดท้าย อาหารเลี้ยงเชื้อจึงเปลี่ยนสีที่ก้นหลอดเป็นสีเหลืองและส่วนบนเป็นสีแดง ส่วนแบคทีเรียที่ใช้แลคโตสและหรือซูโครสได้จะทำให้เกิดกรดมากขึ้น อาหารทดสอบจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอด แบคทีเรียที่สร้างก๊าซได้จากการหมักย่อยน้ำตาลก็จะเห็นเป็นฟองอากาศในอาหารทดสอบนอกจากนี้ในอาหารทดสอบ TSI ยังมี FeSO_4 ผสมอยู่เพื่อทดสอบการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen sulfide; H_2S) หากแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยาแทนที่กับ FeSO_4 ได้เป็น FeS ซึ่งเห็นเป็นสีดำในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cappuccino and Sherman, 2001)

2.5.1.3 การใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน (Simmon citrate test)

ในการหมักกรณีที่ไม่มีการใช้กลูโคสหรือแลคโตสจุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างพลังงานได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับเอนไซม์ citrate permease ทำหน้าที่ในการขนส่งซิเตรทเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ โดยซิเตรทถูกใช้เป็นสารตัวกลางในการเข้าสู่ Krebs cycle และผลิตกรดออกซาลออะซิติกและกรดอะซิติกด้วยเอนไซม์ citrase และผลผลิตกรดที่ได้ถูกเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกและคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังรูปที่ 2.6 หลังจากนั้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับโซเดียมและน้ำได้เป็นโซเดียมคาร์บอเนต ทำให้อาหารเกิดสภาวะความเป็นด่าง มีผลให้อินดิเคเตอร์ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ bromthymol blue เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินในสภาวะที่เป็นด่าง แต่ถ้าจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ซิเตรทได้สีของอาหารจะยังคงเป็นสีเขียว (Cappuccino and Sherman, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



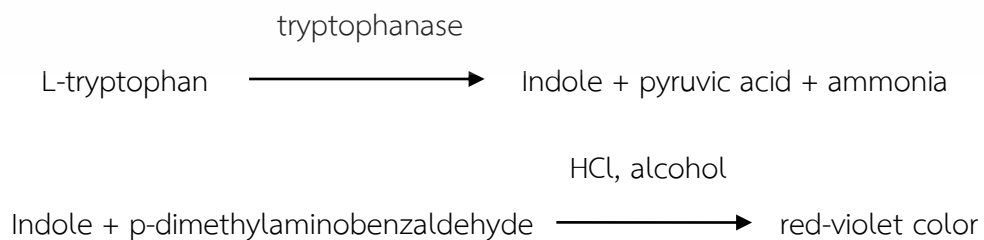
รูปที่ 2.6 การย่อยซิเตรทด้วยเอนไซม์ (Cappuccino and Sherman, 2001)

2.5.2 การใช้โปรตีนในการเจริญเติบโต

แบคทีเรียที่สามารถสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้กรดอะมิโนซึ่งนำมาใช้เป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์การย่อยโปรตีนอาจเกิดจากการ deamination หรือ decarboxylation ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีเอนไซม์ย่อยสลายกรดอะมิโนหรือโปรตีนได้แตกต่างกันจึงเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อได้ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อทำได้โดยอาศัยการตรวจวัดผลผลิตสุดท้ายของการย่อย เช่น การตรวจหาอินโดล ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการย่อย tryptophan ด้วย tryptophenase หรือการวัดความเป็นด่างของแอมโมเนียซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการย่อยยูเรียด้วยเอนไซม์ยูเรียเอส เป็นต้น (อรษา และเฟื่องฟ้า, 2548)

2.5.2.1 การทดสอบสารอินโดล (Indole test)

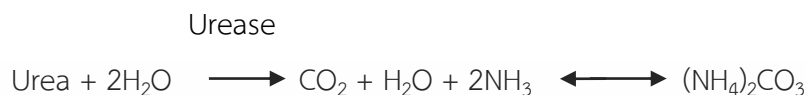
เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการย่อย tryptophan เชื้อที่สามารถย่อยได้จะมีเอนไซม์ tryptophanase ซึ่งย่อย tryptophan แล้วให้อินโดล กรดไพรูวิก และแอมโมเนียเป็นผลผลิตสุดท้าย การทดสอบว่าเกิดอินโดลหรือไม่ทำโดยหยดน้ำยา Kovac's reagent (dimethylaminobenzaldehyde) ลงในหลอดที่เพาะเชื้อ สาร Kovac's reagent จะทำปฏิกิริยากับอินโดลเกิดเป็นสารสีม่วงแดง (Cappuccino and Sherman, 2001)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.2 การทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test)

เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส โดยเอนไซม์ยูรีเอสจะสลายยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อและได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นแอมโมเนียมคาร์บอเนต ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง ทำให้ฟีนอลเรดที่ใช้เป็น pH indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้มหรือม่วงแดง (Cappuccino and Sherman, 2001)



2.5.2.3 การทดสอบเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase)

การทดสอบความสามารถในการย่อยกรดอะมิโน เช่น ไลซีน (lysine) ออโรนิน (ornithine) และอาร์จินีน (arginine) โดยใช้เอนไซม์ decarboxylase ซึ่งได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นเอมีนและคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นด่าง และใช้ brom-cresol purple เป็น pH indicator (Cappuccino and Sherman, 2001; อรษา และเพ็ญฟ้า, 2548)



2.5.3 การทดสอบหาการสร้างเอนไซม์

การสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียเป็นคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่เป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย ซึ่งใช้ในการจำแนกแบคทีเรียได้

2.5.3.1 การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส (Catalase)

เป็นการตรวจหาเอนไซม์คาตาเลสในเชื้อแบคทีเรียโดยเอนไซม์จากเชื้อจะสลาย H_2O_2 ได้เป็นน้ำกับออกซิเจนเกิดเป็นฟองก๊าซให้เห็นได้ สามารถทดสอบโดยใช้ 3% hydrogen peroxide (Cappuccino and Sherman, 2001)



2.5.3.2 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)

เป็นการทดสอบหา Cytochrome oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการหายใจของแบคทีเรีย หากเซลล์มีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารทดสอบคือ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารไม่มีสีกลายเป็นสีม่วงเข้ม (Cappuccino and Sherman, 2001)

2.5.4 ความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตของ Clostridia และลักษณะทางฟีโนไทป์

Keis. et al. (2001) ได้ศึกษาความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Clostridium* 4 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถผลิตตัวอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลได้ ได้แก่ *C. acetobutylicum* *C. saccharoperbutylacetonicum* *C. saccharobutylicum* และ *C. beijerinckii* พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถผลิตสารอินโดล (indole) เอนไซม์ urease และ catalase แต่เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถย่อย aesculin ได้ และสามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนส (arabinose) ไชโลส (xylose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) แซคคาโรส (saccharose) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucopyranoside) แรฟฟิโนส (raffinose) ซาลิซิน (salicin) อะไมดาลิน (amygdalin) แป้ง (starch) และเด็กซ์ตริน (dextrin) ได้ จากตารางที่ 2.5 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถใช้น้ำตาล 5 คาร์บอน ในการเจริญเติบโตได้ ได้แก่ อะราบิโนส ไชโลส และไรโบส และมีเพียง *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. acetobutylicum* และ *C. saccharobutylicum* ที่ไม่สามารถใช้ไรโบสหรือใช้ไม่ได้ในขณะ *C. beijerinckii* ทั้งหมด 9 strain จาก 16 strain ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาล 5 คาร์บอนได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถใช้น้ำตาล 6 คาร์บอนได้ทั้งหมด แต่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถใช้กลีเซอรอลได้เพียงเล็กน้อยหรือไม่สามารถใช้ได้เลย สำหรับน้ำตาลแรมโนส (Rhamnose) เชื้อใช้ได้เล็กน้อยหรือไม่สามารถใช้ได้เลย ในขณะที่เชื้อ *C. saccharobutylicum* ไม่สามารถใช้เพคติน (pectin) ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ซับซ้อน ดังนั้นจึงสามารถนำลักษณะดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างกับเชื้ออีก 3 สายพันธุ์ได้ นอกจากนี้เชื้อ *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* และ *C. saccharobutylicum* สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ในขณะที่ *C. beijerinckii* ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ ยกเว้น strain NRRL B593 ที่ย่อยได้ก็ต่อเมื่อเจลาตินมีสถานะเป็นของเหลวเท่านั้น จากผลการทดสอบลักษณะทางฟีโนไทป์เหล่านี้สามารถนำมาระบุลักษณะที่แตกต่างกันเพื่อจัดจำแนก *Clostridium* ที่มีความสามารถผลิตด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยจัดจำแนกได้จากการไวต่อยา rifampicin การย่อยสลายเจลาติน การใช้เพคติน และการผลิต riboflavin จากนม เช่น เชื้อ *C. acetobutylicum* แตกต่างจาก *C. beijerinckii* คือมีความไวต่อยา rifampicin มีความสามารถในการผลิต riboflavin และเกิดการย่อยด้วยเจลาติน แต่ *C. beijerinckii* ไม่สามารถผลิต riboflavin และมีเพียง strain NRRL B593 เท่านั้นที่สามารถย่อยเจลาตินได้ และพบเฉพาะ strain NCIMB 9579 และ NCIMB 9580 ที่มีความไวต่อยา rifampicin อีกทั้งยังสามารถแยกความแตกต่างของ *C. acetobutylicum* กับ *C. saccharobutylicum* ได้ โดยพิจารณาความสามารถในการใช้เพคตินและการผลิต riboflavin โดยที่ *C. saccharobutylicum* ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีโมเลกุลซับซ้อนหรือผลิต riboflavin ได้ อย่างไรก็ตามการแยกความแตกต่างระหว่าง *C. beijerinckii* กับ *C. saccharoperbutylacetonicum* พิจารณาได้จากการย่อยเจลาติน

และความสามารถด้านอื่นๆ ตามการรายงานของ Johnson. et al. (1997) ยกตัวอย่างเช่น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. saccharoperbutylaceticum ไม่สามารถทำให้เกิดการก่อตัวของนมเปรี้ยวได้ในที่ 48 ชั่วโมง แต่ *C. beijerinckii* สามารถทำให้เกิดการก่อตัวของนมเปรี้ยวภายใน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.5 การย่อยคาร์โบไฮเดรตและลักษณะทางฟิโนไทป์ของ *Clostridium* 4 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้ (Keis. et al., 2001)

Characteristic	1	2	3	4
Number of strain	7	16	2	4
Susceptibility to rifampicin	s	(r)	r	s
Riboflavin (yellow pigment) produced in milk*	+	-	-	-
Gelatin liquefaction	+	(-)	+	+
Utilization of:				
Ribose	-	d	-	w
Glycerol	w	w	-	-
D-Arabitol	-	(+)	+	-/+
L- Arabitol	-	(+)	+	-/+
Dulcitol	-	(+)	d	-
Inositol	-	+	d	+
Mannitol	+	+	+	-/+
Sorbitol	d	+	d	-
Melezitose	(-)	+	+	-
Melibiose	(-)	(+)	+	+
Rhamnose	-	(w)	w	-
Trehalose	(-)	+	+	+
Turanose	(w)	+	+	+
Glycogen	+	(+)	+	+
Inulin	d	+	+	+/-
Pectic	+	+	+	-

หมายเหตุ: 1, *C. acetobutylicum*; 2, *C. beijerinckii*; 3, *C. saccharoperbutylaceticum*; 4, *C. saccharobutylicum*; s, มีความไวต่อ rifampicin 10 ng/แผ่น และ 100 ng/แผ่น; r, ทนต่อ rifampicin 10 ng/แผ่น และ 100 ng/แผ่น; (r) สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ความต้านทาน; +, ผลบวก; -, ผลลบ; w, เล็กน้อย; (+) สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นบวก; (-) สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นลบ; (w) สายพันธุ์ส่วนใหญ่ใช้ได้เล็กน้อย; d, 40-60% เป็นบวก; +/-, เป็นบวกส่วนใหญ่ในบางเวลา; -/+, เป็นลบส่วนใหญ่ในบางเวลา; * ที่มา: Johnson. et al. (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 เผือก (Taro)

เผือกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Colocasia esculenta* (L.) Schott จัดเป็นพืชหัวชนิดหนึ่งมักปลูกในประเทศเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนมากถึง 43 ประเทศจากทั่วโลก ส่วนใหญ่ปลูกในแอฟริกามากที่สุดถึง 60% ในเอเชีย 32% และในหมู่เกาะแปซิฟิก 8% (Sen. et al., 2001) มักปลูกเพื่อบริโภคในท้องถิ่นมากกว่าเพื่อการค้าบางประเทศนิยมรับประทานเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะชาวพื้นเมืองของฮาวายเป็นพวกที่บริโภคเผือกมากที่สุด สำหรับประเทศไทยนั้นเผือกถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญอีกพืชหนึ่งมักใช้ประกอบเป็นอาหารคาวและผลิตภัณฑ์ขนมต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณการปลูกเผือกนั้นยังไม่มากเหมือนพืชชนิดอื่น จากสถิติปี 2511 ประเทศไทยสามารถผลิตเผือกได้ปีละประมาณ 63,347 ตัน ในเนื้อที่เพาะปลูก 75,984 ไร่ และคาดว่าปริมาณการใช้เผือกจะต้องเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามความต้องการของประชากรที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในประเทศไทยมีเผือกอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด ได้แก่ เผือกหอม (หัวมีขนาดใหญ่ แต่ละหัวมีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม และมีหัวเล็กติดอยู่กับหัวใหญ่เล็กน้อย มีกลิ่นหอม ส่วนกาบใบเป็นสีเขียวมีขนาดใหญ่) เผือกเหลือง (หัวมีสีเหลืองขนาดย่อม) เผือกไม้หรือเผือกไหหลำ (หัวมีขนาดเล็ก) และเผือกตาแดง (ตาของหัวเป็นสีแดงเข้ม มีหัวเล็กล้อมรอบหัวใหญ่เป็นกลุ่มจำนวนมาก กาบใบและเส้นใบเป็นสีแดง) (ไสว และคณะ, 2523)

ลักษณะโดยทั่วไปมีลำต้นเป็นหัวอยู่ใต้ดินประกอบด้วยหัวใหญ่ 1 หัว และมีหัวเล็กๆ แตกออก รอบๆ ซึ่งขนาดรูปร่างของหัว สีของเนื้อเผือก มีความแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ ลำต้นสูง 0.4-2 เมตร และยังมีลำต้นใต้ดินที่นอกจากหัวเผือกคือคอร์ม (corm) ดังรูปที่ 2.7 และรูปที่ 2.8 สามารถนำมาใช้ทำอาหารและขนมได้ ใบและก้านใบสามารถกินเป็นผักได้เช่นกัน แต่ในหัวและต้นเผือกนั้นมีผลึกแคลเซียมออกซาเลต (calcium oxalate) ซึ่งทำให้เกิดอาการคัน เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่นๆ ในวงศ์เดียวกัน เช่น บุก และบอน ดังนั้นทุกส่วนจึงต้องผ่านการต้มหรือหมักก่อนจึงจะกินได้ (ศศิวิมล และคณะ, 2546) ใบเผือกมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงเวียน มีขนาดใหญ่ ลักษณะของใบเป็นรูปหัวใจหรือเป็นรูปลูกศรแกมรูปหัวใจ ปลายใบแหลม โคนใบแต่ละด้านกลมหรือเป็นเหลี่ยม เห็นเส้นใบได้ชัดเจน ก้านใบอาจยาวได้ถึง 1 เมตร มีขนาดและสีที่ต่างกันตามสายพันธุ์ โดยใบจะเกิดจากใต้ดินสำหรับการออกดอกของเผือกจะออกดอกเป็นช่อ ช่อดอกเป็นช่อเชิงลดมีกาบ ออกเดี่ยวหรือหลายช่อ ก้านช่อดอกมีความยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร สั้นกว่าก้านใบ กาบหุ้มช่อดอกยาวประมาณ 15-35 เซนติเมตร ลักษณะตั้งตรงเป็นสีเขียว ปลายกาบเรียวแหลมยาวคล้ายหาง ช่อดอกสั้นกว่ากาบดอกจะทยอยบานเรื่อย ๆ ดอกเพศเมียมักจะไม่มีส่วนดอกเพศผู้ในหนึ่งดอกจะมีก้านเกสรเพศผู้ 2-3 ก้าน ผลเป็นสีเขียวเปลือกบางไม่ค่อยมีเมล็ด แต่บางสายพันธุ์ก็ติดเมล็ดได้ (ไสว และคณะ, 2523)



รูปที่ 2.7 ลักษณะโดยทั่วไปของเผือก

ที่มา (ออนไลน์): <http://kanchanapisek.or.th/kp6/pictures5/l5-165a.jpg>

(วันที่สืบค้น 18 พฤศจิกายน 2560)



รูปที่ 2.8 ลักษณะของผลเผือก

ที่มา (ออนไลน์): <https://health.mthai.com/app/uploads/2014/07/175773411.jpg>

(วันที่สืบค้น 18 พฤศจิกายน 2560)

2.6.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเผือก

ใบและยอดเผือก ทั้งใบและยอดเป็นผักสามารถกินได้ ประกอบด้วยวิตามินเอ และวิตามินซีสูง โดยในใบมีวิตามินเอ 20,885 IU ต่อ 100 กรัมของส่วนที่กินได้ มีวิตามินซี 142 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ในยอดมีวิตามินเอ 335 IU ต่อ 100 กรัม มีวิตามินซี 8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ไสว และคณะ, 2523)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวเผือก องค์ประกอบส่วนใหญ่ของหัวเผือกนั้นเป็นสารประเภทแป้ง โดยมีคาร์โบไฮเดรต 77 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 6.75 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.74 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 3.35 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 0.52 เปอร์เซ็นต์ (สิริมา และคณะ, 2558) มีวิตามินซีมากประมาณ 7-9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของส่วนที่กินได้ ไทอามีนประมาณ 0.8 มิลลิกรัม ไบโอฟลาเวิน 0.04 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.9 มิลลิกรัม เม็ดแป้งมีขนาดเล็กมากประกอบด้วยสองประเภท ประเภทหนึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 ไมครอน อีกประเภทหนึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 ไมครอน ด้วยเหตุนี้แป้งเผือกจึงย่อยง่ายแต่ไม่เหมาะที่จะใช้ในด้านอุตสาหกรรมแป้ง (ไสว และคณะ, 2523) ส่วนเปลือกเผือกมีองค์ประกอบเป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งประกอบด้วย เซลลูโลส 7.67 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เฮมิเซลลูโลส 8.70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และลิกนิน 3.65 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (สิริมา และคณะ, 2558)

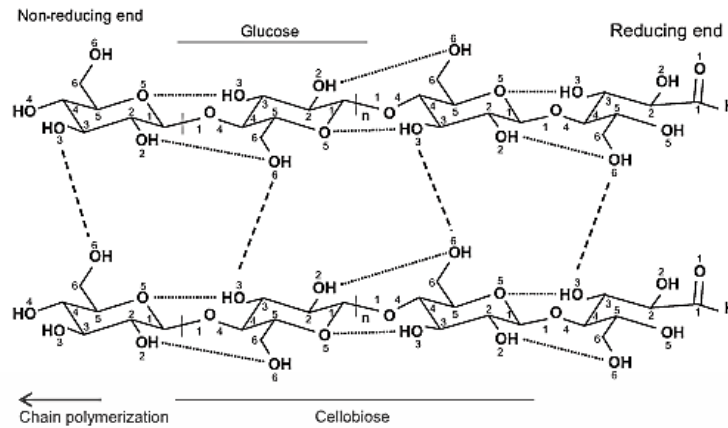
2.6.2.1 ลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

ลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของพืชที่มีเนื้อเยื่อระบบท่อลำเลียง ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในพืชแต่ละชนิดจะพบในปริมาณที่ต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.6 โดยพอลิเมอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ยึดจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นต้น จึงทำให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรง (สุขใจ, 2554) โดยลิกโนเซลลูโลสพบในเศษวัสดุเหลือทิ้งจากไม้ทั้งไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน เศษวัสดุจากการเกษตร เช่น ชังข้าวโพด เส้นใยข้าวโพด ชานอ้อย แกลบ และฟางข้าว เป็นต้น (อรุณี, 2555)

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสในพืชที่มีระบบท่อลำเลียง (Glazer and Nikaido, 2007)

แหล่งลิกโนเซลลูโลส	ลิกนิน (%)	เซลลูโลส (%)	เฮมิเซลลูโลส (%)
หญ้า (Grassrs)	10-30	25-40	25-50
ไม้เนื้ออ่อน (Softwoods)	25-35	45-50	25-35
ไม้เนื้อแข็ง (Hardwoods)	18-25	45-55	24-40

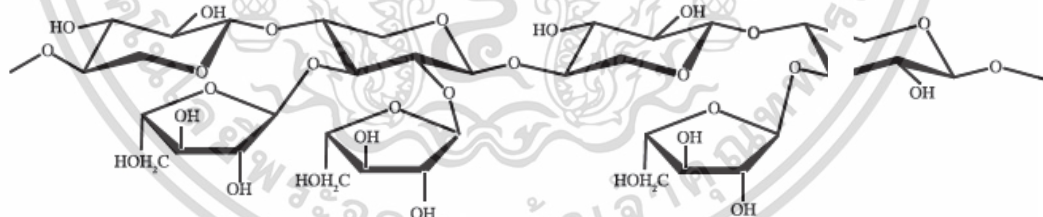
1. เซลลูโลส (Cellulose) $[C_6(H_2O)_5]_n$ เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด ทุกๆ ปีจะมีการผลิตเซลลูโลสจากพืชมากกว่า 10^{11} เมตริกตัน เซลลูโลสเป็นโฮโมโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีกิ่งก้าน ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ β -D-Glucopyranose เชื่อมต่อดัวยพันธะ β -1,4-glycosidic bond ดังรูปที่ 2.9 มีความยาวตามธรรมชาติประมาณ 10,000 หน่วย ยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปในธรรมชาติพบเซลลูโลส 2 แบบ คือ crystalline cellulose และ amorphous cellulose ซึ่ง amorphous cellulose มีความไวกับสารเคมีและเอนไซม์มากกว่า ดังนั้นจึงเป็นส่วนที่ง่ายต่อการถูกย่อยด้วยปฏิกิริยาของกรด-เบสหรือเอนไซม์ (รัชพล, 2558; สุขใจ, 2554)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของเซลลูโลส

(ที่มา: Buselli. *et al*, 2007)

2. เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) $[C_5(H_2O)_4]_n$ หรือ $[C_6(H_2O)_5]_n$ ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความซับซ้อนโดยธรรมชาติมีโครงสร้างเป็นแบบ amorphous สายโซ่หลักคล้ายกับเซลลูโลสเพราะว่าเชื่อมต่อกันด้วยหน่วยของ β -1,4-D-pyranosyl แต่มีระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization; DP) ต่ำกว่าเซลลูโลส คือประมาณ 50-300 มีโครงสร้างที่เป็นสายกิ่งมาก และเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ หลายชนิดผสมกัน ได้แก่ ไซโลส (D-xylose) อะราบิโนส (L-arabinose) กาแล็กโทส (D-galactose, L-galactose) แมนโนส (D-mannose) แรมโนส (L-rhamose) และฟิวโคส (L-fucose) แสดงดังรูปที่ 2.10 (Bastawde, 1992; สุขใจ, 2554)

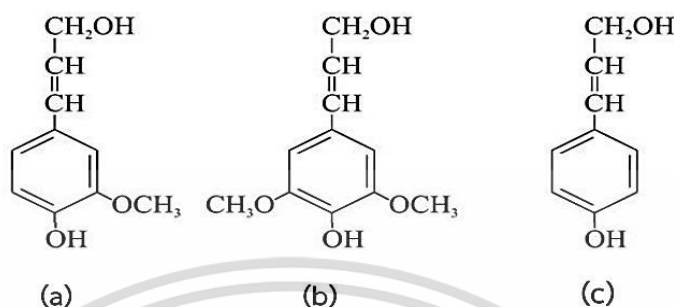


รูปที่ 2.10 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

(ที่มา: Chesson, 1987)

3. ลิกนิน (Lignin) $(C_{10}H_{12}O_4)_n$ เป็นสารประกอบประเภทอะโรมาติกมีโครงสร้างซับซ้อนมาก หน่วยย่อยประกอบด้วยฟีนิลโพรเพน [phenylpropane (C_9)] หรือฟีนิลแอลกอฮอล์ (phenylpropionic alcohol) เชื่อมต่อกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยลิกนินเป็นตัวเชื่อมเพื่อยึดให้เส้นใยเซลลูโลสรวมกัน ทำให้แยกลิกนินได้ยากมาก และเป็นส่วนป้องกันเซลลูโลสไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งองค์ประกอบของลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแบบ 3 มิติ ไม่ตกผลึก ประกอบด้วยสารประกอบอะโรมาติก 3 ชนิด เรียกว่า mono-lignol ประกอบด้วย tran-p-เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

coumaryl alcohol, trans-coniferyl alcohol และ trans-*p*-sinapyl alcohol ดังแสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.11 นอกจากนี้โมเลกุลของลิกนินยังเชื่อมต่อกับสารประกอบอะโรมาติกอื่นอีกมากมาย เช่น vanillin และ syringaldehyde



รูปที่ 2.11 สารตั้งต้นในของการสังเคราะห์ลิกนินประกอบด้วย *p*-hydroxycinnamylalcohol 3 ชนิด: (a) trans-coniferyl alcohol; (b) trans-*p*-sinapyl alcohol และ (c) trans-coumaryl alcohol (Glazer and Nikaido, 2007)

2.6.2.2 แป้ง (starch)

แป้งเป็นโพลิเมอร์ของกลูโคสที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งมีหน่วยพื้นฐานเป็น anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -glycosidic ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ของหน่วยกลูโคสกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของหน่วยกลูโคสที่อยู่ถัดไป ด้านปลายของโมเลกุลแป้งจะมี anomeric carbon (C1) ซึ่งไม่ได้จับกับโมเลกุลอื่นๆ ดังนั้นแต่ละโมเลกุลของแป้งจะมีด้านปลายที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (reducing end) ดังนั้นแป้งหนึ่งโมเลกุลจะมีตำแหน่งปลาย reducing 1 ตำแหน่ง โมเลกุลแป้งแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลักๆ ตามขนาดโมเลกุลและลักษณะการจัดเรียงตัว คืออะไมโลส ซึ่งมีขนาดเล็กและมีกิ่งก้านสาขาเพียงเล็กน้อย และอะไมโลเพกตินซึ่งมีขนาดใหญ่และมีกิ่งก้านสาขามากมาย (Beynum and Roels, 1985)

1. อะไมโลส (amylose) เป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,000 – 6,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic อาจพบกิ่งสาขาในรูปแบบโมเลกุลของอะไมโลสได้บ้างแต่มีเล็กน้อย (Hizukuri, 1988) โดยทั่วไปแป้งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลี และแป้งข้าวฟ่าง มีปริมาณอะไมโลสสูงประมาณ 22-30% ส่วนแป้งจากรากและหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง แป้งสาชูจะมีปริมาณอะไมโลสต่ำกว่า คืออยู่ในช่วง 18-24% น้ำหนักโมเลกุลอะไมโลสอยู่ในช่วง 105 ถึง 106 ดาลตัน โดยอะไมโลสในแป้งแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป (Hizukuri, 1988)

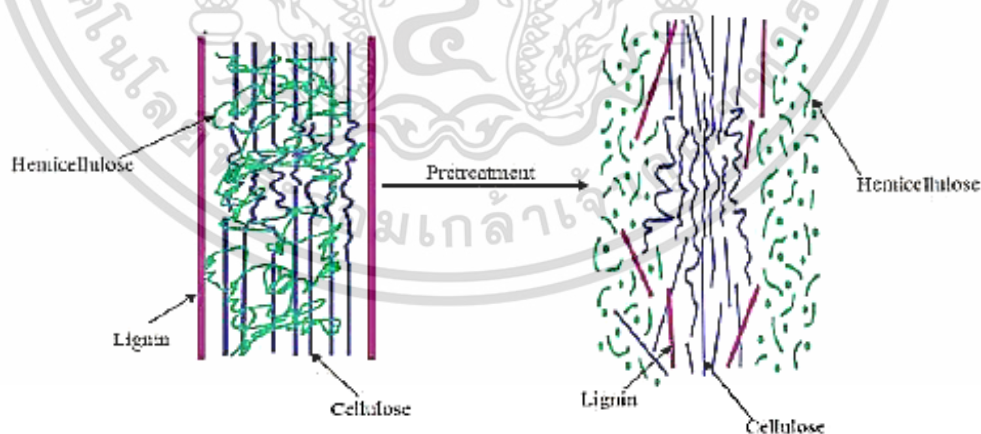
2. อะไมโลเพกติน (amylopectin) เป็นโพลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วย พันธะ α -1,4- glycosidic และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นโพลิเมอร์กลูโคสสายสั้นเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,6-glycosidic หน่วยกลูโคสที่มีพันธะ α -1,6 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

glycosidic มีอยู่ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณหน่วยกลูโคสในอะไมโลเพคตินทั้งหมด อะไมโลเพคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลส คือประมาณ 107 ถึง 109 คาลตัน และมีการคืนตัวต่ำ เนื่องจากอะไมโลเพคตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง อะไมโลเพคตินทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของเม็ดแป้ง ดังนั้นเมื่อมีอะไมโลเพคตินเพียงอย่างเดียวจึงยังสามารถรวมตัวเป็นเม็ดแป้งได้ (Hizukuri, 1988)

2.7 การปรับสภาพวัตถุดิบ (pretreatment)

การนำวัสดุเหลือใช้หรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักทางชีวภาพเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ นั้น จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน (pretreatment) เพราะวัตถุดิบเหล่านี้มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งยากต่อการย่อยสลายเพื่อเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล (ภูมิหทัย และประมุข, 2554) ด้วยเหตุนี้จึงต้องเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสให้เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยสลายก่อน แสดงดังรูปที่ 2.12 หลังจากวัตถุดิบผ่านกระบวนการปรับสภาพแล้วจึงสามารถนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายเซลลูโลสคือ ความพรุน (porosity) หรือช่องว่างระหว่างพื้นที่ผิวผลึกเส้นใยเซลลูโลส ปริมาณลิกนิน และปริมาณเฮมิเซลลูโลส ซึ่งทำให้เกิดการลดประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลส ดังนั้นการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส การลดขนาดผลึกของเซลลูโลส และการเพิ่มช่องว่าง (ความพรุน) ระหว่างโมเลกุลของวัตถุดิบในกระบวนการเตรียมตัวอย่างเป็นการพัฒนากระบวนการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เซลลูโลสตอบสนองต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ดีขึ้น



รูปที่ 2.12 การเตรียมตัวอย่าง (pretreatment) ในการเปลี่ยนแปลงมวลชีวภาพลิกโนเซลลูโลส (Kumar. *et al*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางกายภาพ (Physical pretreatment)

2.7.1.1 การลดขนาดวัตถุดิบโดยทางกล

วัตถุดิบจะถูกลดขนาดลงโดยการใช้แรงกล เช่น การบด ปั่น โม่ บด ตัด เป็นต้น เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและลดขนาดอนุภาคของลิกโนเซลลูโลสนอกจากนี้ยังเป็นการลดผลึกของเซลลูโลสด้วย โดยทั่วไปหลังจากบดหยาบจะมีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร หลังจากนั้นบดละเอียดจนมีขนาด 0.2-2 มิลลิเมตร (สุขใจ, 2554) ซึ่งพลังงานที่ต้องใช้ในการบดวัตถุดิบขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของวัตถุดิบและขนาดสุดท้ายของชีวมวลที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่วิธีการปรับสภาพทางกายภาพจะใช้ร่วมกับกระบวนการปรับสภาพอื่นๆ ด้วย

2.7.1.2 การย่อยวัตถุดิบด้วยความร้อน

การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยการย่อยด้วยความร้อน เมื่อวัตถุดิบได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เซลลูโลสถูกย่อยอย่างรวดเร็วกลายเป็นเถ้าและก๊าซ การย่อยจะเกิดช้าลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 300 องศาเซลเซียส วัตถุดิบที่ผ่านการย่อยด้วยความร้อนจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจาง (กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง) ซึ่งส่งผลให้เกิดการย่อยเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ถึง 80-85 เปอร์เซ็นต์ โดยได้กลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถไฮโดรไลซ์ในอุณหภูมิที่ต่ำลงได้เมื่อเติมซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) หรือโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (สุขใจ, 2554)

2.7.2 การปรับสภาพโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพมีการใช้จุลินทรีย์ เช่น brown-rot fungi, white-rot fungi และ soft-rot fungi เพื่อย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัสดุเหลือใช้ต่างๆ โดย brown-rot ทำลายเซลลูโลสขณะที่ white และ soft ทำลายทั้งเซลลูโลสและลิกนิน

White-rot fungi เป็นฟังไจในคลาส *Basidiomycetes* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับกระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพของลิกโนเซลลูโลส ซึ่ง Hatakka (1983) ได้ศึกษาการเตรียมตัวอย่างฟางข้าวโดย white-rot fungi 19 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Pleurotus ostreatus* สามารถย่อยฟางข้าวได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 35 เปอร์เซ็นต์ ใน 5 สัปดาห์ และ Akin. et al. (1995) ได้รายงานการกำจัดลิกนินของหญ้าสายพันธุ์เบอร์มิวดาโดยใช้ *Cyathus stercoreus* พบว่าได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 63-77 เปอร์เซ็นต์ หลังจากกระบวนการผ่านไป 6 สัปดาห์

เชื้อ *Phanerochaete chrysosporium* ซึ่งเป็น white-rot fungi สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยลิกนินได้ คือ lignin peroxidases และสามารถผลิตเอนไซม์ manganese-dependent peroxidases ระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกหลั่งออกมาออกเซลล์พบได้ใน filtrate ของ white-rot fungi ในการย่อยสลายผลผลิตเซลล์ของเนื้อไม้ ส่วนเอนไซม์อื่นๆ เช่น polyphenol oxidase, laccases, H_2O_2 producing enzyme และ quinone-reducing enzyme ก็สามารถย่อยสลายลิกนินได้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ คือต้องการพลังงานต่ำภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่รุนแรง อย่างไรก็ตามอัตราการไฮโดรไลซ์โดยกระบวนการเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพใช้เวลานานมาก (สุขใจ, 2554)

2.7.3 เอนไซม์อะไมเลส (amylase)

α -amylase มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl[®] และมีชื่อสามัญว่า diastase และมีชื่อตามระบบว่า α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และคน ซึ่งจะพบในส่วนของน้ำลาย และตับอ่อน มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโอลิโกแซ็กคาไรด์หรือพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แป้งและไกลโคเจน มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายพันธะ α -1,4-glycosidic ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์ได้เป็นกลูแคน (glucan) และเดกซ์ทริน (dextrin) ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย (Boer. *et al.*, 1996)

β -amylase มีชื่อตามระบบว่า α -1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่นข้าวบาร์เลย์ที่กำลังออกเป็นข้าวมอลต์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับ α -amylase ปฏิริยาการย่อยสลายของ β -amylase จำเพาะเจาะจงต่อพันธะ α -1,4-glycosidic ในลักษณะตัดสายพอลิเมอร์จากปลายสายที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์ที่ละ 1 หรือ 2 โมเลกุล และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะ α -1,6-glycosidic (Boer. *et al.*, 1996)

γ -amylase มีชื่อตามระบบว่า γ -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ซึ่งลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายสตาร์ช คือสามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ได้แก่ α -1,4, α -1,6 และ α -1,3 การตัดสายพอลิเมอร์เหมือนกับ β -amylase แต่ตัดปลายสายเข้าที่ละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคส (Pandey. *et al.*, 2000)

2.7.4 เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

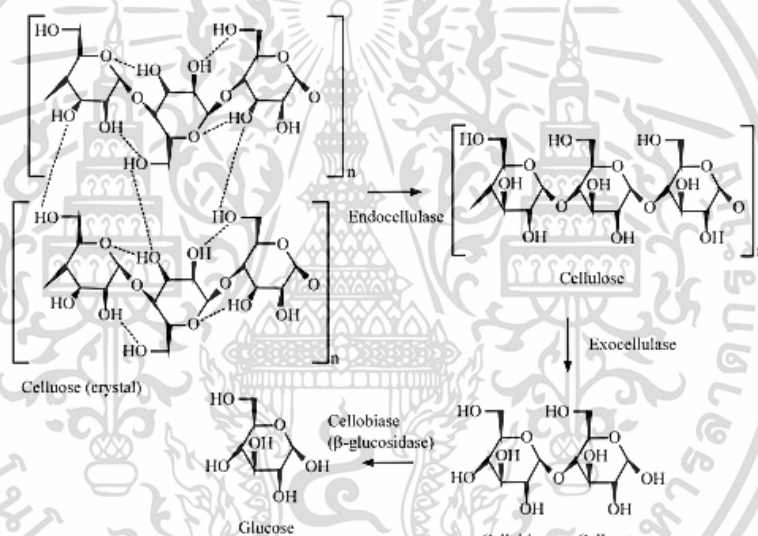
เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 กลุ่มหลัก คือเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือเซลโลไฮโดรเลส (cellulohydrolase) และ บีตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) หรือเซลโลไบเอส (cellobiase) (Bhat, 2000; Karmakar and ray, 2011; เปี่ยมสุข, 2551)

เอนโดกลูคาเนสหรือเอนโด-บีตา-1,4-กลูคาเนส (E.C.3.2.1.4) มีชื่อตามระบบคือ 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส โดยย่อยสลายพันธะที่ตำแหน่ง β -1,4-glycosidic แบบสุ่ม ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด คือ เซลโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (cellooligo-saccharides) เซลโลเพนทาออส (cellopentaose) เซลโลไตรออส (cellotriose) เซลโลไบออส (cellobiose) และกลูโคส

Exoglucanase หรือ Exo-1,4-glucanase พบว่ามักทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนสในการย่อยโมเลกุลของเซลลูโลส โดยการย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing) ของเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายส่วนใหญ่ คือ น้ำตาล เซลโลไบโอส นอกจากนี้ ยังพบว่าสามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (microcrystalline cellulose) ได้โดยอาศัยการทำงานร่วมกับเอนโดกลูคาเนส

เอนไซม์ β -1,4-glucosylase หรือ cellobiase (E.C.3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลโลไบโอส เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลซับซ้อนขนาดใหญ่ของเซลลูโลสได้โดยตรง

กลไกการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสทั้งในส่วนที่เป็นระเบียบ (crystalline) และไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 กลไกการทำงานของเซลลูเลส (Karmakar and ray, 2011)

2.7.5 เอนไซม์ ACCELLERASE 1500

เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน ได้แก่ Exoglucanase, Endoglucanase, Hemi-cellulase, β -glycosidic และอื่นๆ ที่สามารถย่อยลิกโนเซลลูโลสได้เป็นอย่างดี ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesei* ใช้สำหรับย่อยลิกโนเซลลูโลสในอุตสาหกรรมทั้งอุตสาหกรรมพลังงานทางเลือกและอุตสาหกรรมเคมี จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตตัวทำละลาย และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายได้สะดวกยิ่งขึ้น ข้อดีของเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 เมื่อเทียบกับเอนไซม์เซลลูเลสทั่วไปกล่าวคือสามารถย่อยสารตั้งต้นได้หลายชนิดทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย มีกิจกรรมของเอนไซม์ β -glycosidic สูงซึ่งจะช่วยย่อยเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคสได้ ทำให้เกิดอัตราการย่อยสูงขึ้นและกระบวนการผลิตตัวทำละลายเร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์หรือข้อดีในการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร กรุณาแจ้งให้เจ้าของเอกสารทราบเพื่อที่จะสามารถนำเอกสารนี้ไปใช้ได้อย่างถูกต้อง

โดยประสิทธิภาพในการย่อยเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ และการย่อยเกิดไม่สมบูรณ์ หากเอนไซม์ชนิดหนึ่งถูกแยกออกไป (ออนไลน์: http://accelerace.dupont.com/fileadmin/user_upload/live/accelerace/documents/DUP-00413_ProdSheet_1500_web.pdf, วันที่สืบค้น 12 กรกฎาคม 2559)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8.1 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium*

Panitz. *et al.* (2014) ได้รายงานการคัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ GT6 ที่สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนในแหล่งน้ำนิ่ง จากการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ GT6 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย *C. tetanomorphum* มีความคล้ายคลึงกันกับ *C. tetanomorphum* 4474(T) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ GT6 มีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลากหลาย ประกอบด้วย กลูโคส ฟรุกโตส มอลโทส ซาโลส และกลีเซอรอล ในการผลิตบิวทานอล โดยไม่ผลิตอะซิโตน แต่ผลิตเอทานอล กรดบิวทิริก กรดอะซิติก และ 1,3-propanediol ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารและสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นคือบิวทานอล ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 11.5 กรัมต่อลิตร ที่กลีเซอรอลเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ถึง 14 กรัมต่อลิตร ภายใน 72 ชั่วโมง และยังสามารถเจริญเติบโตได้ที่กลีเซอรอลเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่สามารถผลิต ABE ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ได้จำนวน 107 ไอโซเลต จากดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตรที่แตกต่างกันในเมือง Assiut ประเทศ Egypt เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร T6 พบว่ามีเพียง 80 ไอโซเลต จาก 107 ไอโซเลต ที่สามารถผลิต ABE มีค่าระหว่าง 0.036 ถึง 31.89 กรัมต่อลิตร เชื้อที่สามารถผลิต ABE ได้สูง ถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เพาะปลูกมันฝรั่ง ซึ่งมีทั้งหมด 27 ไอโซเลต ตามด้วยตัวอย่างดินเพาะปลูกข้าวสาลี 18 ไอโซเลต และจากตัวอย่างดินเพาะปลูกหัวหอม 10 ไอโซเลต ในทางกลับกันมีเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต ABE ได้มากกว่าเชื้ออ้างอิงคือ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งผลิต ABE ได้ 11.543 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์พีเอ็นไพบ์และยีน 16S rRNA ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าเป็น *C. beijerinckii* ASU10 (KF372577), *C. chauvoei* ASU55 (KF372580) และ *C. roseum* ASU58 (KF372581) เมื่อทำการหมักในอาหารเหลว T6 พบว่า *C. roseum* ASU58 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 16.77 กรัมต่อลิตร และ ABE 29.81 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 10.34 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 2.70 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ *C. beijerinckii* ASU10 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 15.66 กรัมต่อลิตร และ ABE 31.89 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 14.61 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 1.62 กรัมต่อลิตร) และ *C. chauvoei* ASU55 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 12.92 กรัมต่อลิตร และ ABE 19.24 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 4.84 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 1.48 กรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Al-Shorgani. *et al.* (2016a) รายงานการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายจากดินเพาะปลูกข้าวโดยทำการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อที่แยกได้ พบว่ามีความใกล้เคียงกันกับ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่ระดับความใกล้เคียงกัน 96 เปอร์เซ็นต์ และเรียกเชื้อที่คัดแยกได้ว่า *C. acetobutylicum* YM1 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไบโอบิวทานอลได้ โดยใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย ประกอบด้วย กลูโคส ฟรุคโตส ไฮโลส อะราบิโนส กลีเซอรอล แลคโตส เซลโลไบโอส แมนนิทอล มอลโตส กาแลคโตส ซูโครส และแมนโนส พบว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดเมื่อหมักโดยใช้ฟรุคโตส (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสารตั้งต้นคือ 7.27 กรัมต่อลิตร และ ABE 10.22 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.31 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.64 กรัมต่อลิตร)

Shin. *et al.* (2016) รายงานการคัดแยกเชื้อ *C. kogasensis* sp. จากดินใต้ท่อขนส่งก๊าซธรรมชาติที่เกิดการสึกกร่อน ได้ค้นพบแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ YHK0403T และ YHK0508 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน (obligately anaerobic) สามารถสร้างสปอร์ได้ เซลล์รูปท่อน และสามารถเคลื่อนที่ได้โดยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ จากการวิเคราะห์ Phylogenetic บริเวณลำดับยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในสกุล *Clostridium* มีชื่อว่า *C. kogasensis* (สายพันธุ์ YHK0403^T = KCTC 15258^T = JCM 18719^T) และมีความใกล้เคียงกับเชื้อ 4 สายพันธุ์คือ *C. scatologenes* KCTC 5588T (95.8 เปอร์เซ็นต์) *C. magnum* KCTC 15177T (95.8 เปอร์เซ็นต์) *C. drakei* KCTC 5440T (95.7 เปอร์เซ็นต์) และ *C. tyrobutyricum* KCTC 5387T (94.9 เปอร์เซ็นต์) จากกระบวนการหมักกลูโคสด้วยเชื้อที่คัดแยกได้สามารถผลิตกรดบิวทริกได้ 12.2 มิลลิโมล และกรดอะซิติก 9.8 มิลลิโมล และพบว่าสามารถผลิตบิวทานอลและเอทานอลได้แต่ไม่ได้ทำการประมวลเคราะห์ผลในรายงานฉบับนี้

2.8.2 การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมมาเป็นสารตั้งต้นในการหมัก ABE

Thang. *et al.* (2010) ได้รายงานการหมัก ABE โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและมันสำปะหลังเส้นเป็นสารตั้งต้น ด้วยเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ในการหมักแบบ batch ในถังหมักขนาด 1 ลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 มีความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังและมันสำปะหลังเส้นในการผลิต ABE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือสามารถผลิต ABE ได้ 21.0 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 16.9 กรัมต่อลิตร) และ 19.4 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 15.5 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสในหมักสามารถผลิต ABE ได้ 24.2 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 16.2 กรัมต่อลิตร)

Abd-Alla and El-Enany (2012) ใช้อินทผาลัมที่เน่าเสียมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต ABE จากเชื้อสองชนิด คือ *C. acetobutylicum* ATCC 824 และ *Bacillus subtilis* DSM 4451 ซึ่ง *B. subtilis* จะใช้ O₂ ในการเจริญเติบโต และช่วยรักษาสภาวะไร้ออกซิเจนใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างการผลิต ABE ของ *C. acetobutylicum* ATCC 824 จากการหมักโดยใช้อินทผลัมบด 75 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อหมักโดยใช้เชื้อผสม 2 ชนิด ทำให้ได้ผลผลิต ABE มากกว่าการหมักโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 เพียงชนิดเดียว คือสามารถผลิต ABE ได้มากที่สุด 21.56 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 14.90 กรัมต่อลิตร อะซิโตน 5.80 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.86 กรัมต่อลิตร) และมีอัตราการผลิต ABE 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยไม่มีการเติม reducing agent และเติมก๊าซ N_2 เข้าไป แต่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร หรือแอมโมเนียมไนเตรต 1.6 กรัมต่อลิตร เพื่อทำให้อัตราการผลิต ABE เพิ่มขึ้น

Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้รายงานการใช้อินทผลัมที่ตกมาตรฐานมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก ABE ด้วยเชื้อที่คัดแยกได้ 3 สายพันธุ์ คือ *C. beijerinckii* ASU10, *C. chauvoei* ASU55 และ *C. roseum* ASU58 จากการใช้อินทผลัม (น้ำตาล 36 กรัมต่อลิตร) ในกระบวนการหมัก พบว่า *C. beijerinckii* ASU10 ให้ผลผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 16.10 กรัมต่อลิตร และ ABE 24.07 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 7.4 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.51 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่เชื้อ *C. roseum* ASU58 และ *C. chauvoei* ASU55 ผลิตบิวทานอลได้ 13.87 และ 9.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่ง *C. acetobutylicum* ATCC 824 ผลิตบิวทานอลได้ 9.71 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *C. beijerinckii* ASU10 และ *C. roseum* ASU58 มีประสิทธิภาพในการผลิต ABE จากอินทผลัมได้ นอกจากนี้การใช้สารตั้งต้นโดยปราศจากการเสริมส่วนประกอบอื่นของอาหารนับว่าเป็นสารตั้งต้นที่ต้องการในการผลิต ABE ทางการค้า

Ndaba and Marx (2015) ได้รายงานการผลิตไบโอบิวทานอลและกรดอินทรีย์จากน้ำข้าวฟ่างหวาน ด้วยเชื้อ *C. acetobutylicum* และ *C. tetanomorphum* โดยใช้หัวเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และอัตราส่วนระหว่างเชื้อสองสายพันธุ์เป็น 3:10, 10:3, 6.5:6.5, 3:3 และ 10:10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 6.49 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมัก 96 ชั่วโมง โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* เพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจากการหมักด้วยเชื้อ *C. tetanomorphum* ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดบิวทริกได้มากกว่า 5 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักสิ้นสุดลง พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 6.5 เป็น 4.6 ผลเนื่องจากการสร้างกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมัก และเมื่อทำการหมักด้วยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่อัตราส่วน 6.5:6.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 2.7 กรัมต่อลิตร อีกทั้งเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในการหมักได้

Al-Shorgani. *et al.* (2016a) ได้คัดแยกเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไบโอบิวทานอล โดยใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างหลากหลาย และยังสามารถใช้โพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง และเซลลูโลสในการผลิตไบโอบิวทานอลได้อีกด้วย โดยมีความสามารถในการผลิตไบโอบิวทานอลจากของเสียทางอุตสาหกรรมเกษตร เช่น รำข้าว (rice bran) รำข้าวที่สกัดน้ำมันออก

(de-oiled rice bran) น้ำทิ้งจากโรงงานปาล์มน้ำมัน และกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (palm kernel) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cake) สามารถการผลิตไบโอชีวทานอลได้ความเข้มข้นสูงสุด 3.49 กรัมต่อลิตร และ ABE 5.31 กรัมต่อลิตร จากการหมักโดยใช้รำข้าวที่สกัดน้ำมันออก (de-oiled rice bran) (น้ำตาล 10.5 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงสามารถใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ในการผลิตไบโอชีวทานอลโดยใช้แหล่งคาร์บอนจากของเสียทางการเกษตรเพื่อผลิตพลังงานทดแทนได้

2.8.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก ABE

Chua. *et al.* (2013) ได้รายงานการผลิต ABE โดยการหมักของเชื้อ *Clostridium sp.* G117 ที่คัดแยกได้ ที่ค่า pH เริ่มต้นแตกต่างกันคือ 5.0, 5.5 และ 6.0 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) พบว่าการหมักที่ค่า pH เริ่มต้น 6.0 ให้ผลผลิตชีวทานอลมากที่สุดคือ 6.45 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ pH เริ่มต้น 5.5 ผลิตชีวทานอลได้ 6.45 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ทำให้สามารถผลิตชีวทานอลได้ 8.25 กรัมต่อลิตร และผลผลิตชีวทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 13.50 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร (pH เริ่มต้น 6.0 และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์)

Al-Shorgani. *et al.* (2016b) ได้รายงานการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตชีวทานอลโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 จากการเพาะเลี้ยงแบบ batch ซึ่งได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคส การเพิ่มกรดบิวทริก และอัตรา C/N โดยการศึกษาที่ละเอียด อย่างไรก็ตาม การทดสอบความเข้มข้นของกลูโคส การเพิ่มกรดบิวทริก และอัตรา C/N เพื่อเหมาะสมต่อการผลิตชีวทานอลโดยใช้ response surface methodology (RSM) วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) และใช้สมการถดถอยแบบโพลีโนเมียลแบบใช้เวลากำลึงสอง นำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.0001$ ต่อความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นบิวทริก และความเข้มข้นของชีวทานอล จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ABE คือการหมักที่ความเข้มข้นกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ค่า C:N ratio คือ 65 และกรดบิวทริก 8.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตชีวทานอลได้ 13.82 กรัมต่อลิตร และผลผลิตชีวทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 17 กรัมต่อลิตร และ ABE 21.71 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 3 ลิตร

Al-Shorgani. *et al.* (2015) รายงานว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติเป็นเอกลักษณ์ในการผลิตไบโอชีวทานอลจากกลูโคสภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และยังมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีและผลิตไบโอชีวทานอลได้ความเข้มข้นสูงในสภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) ที่แตกต่างกัน จากการวิจัยได้รายงานการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลายในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนมีความคล้ายคลึงกันกับการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะใช้ออกซิเจน (100% DO อิมิตัวเริ่มต้น) ซึ่งได้ผลผลิตชีวทานอลสุดท้ายคือ 12.18 และ 12.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเพิ่มผลผลิตไบโอชีวทานอลโดย YM1 ทำได้โดยใช้ reducing agent และเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน อีกทั้งสาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ YM1 ยังมีความแตกต่างทางคุณสมบัติทางของเอนไซม์ ซึ่งทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระของออกซิเจน เช่น superoxide dismutase (SOD) catalase และ NADH/NADPH oxidases ทำให้ง่ายต่อการผลิตไบโอชีวทานอล โดยไม่จำเป็นต้องอัดแก๊สไนโตรเจน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

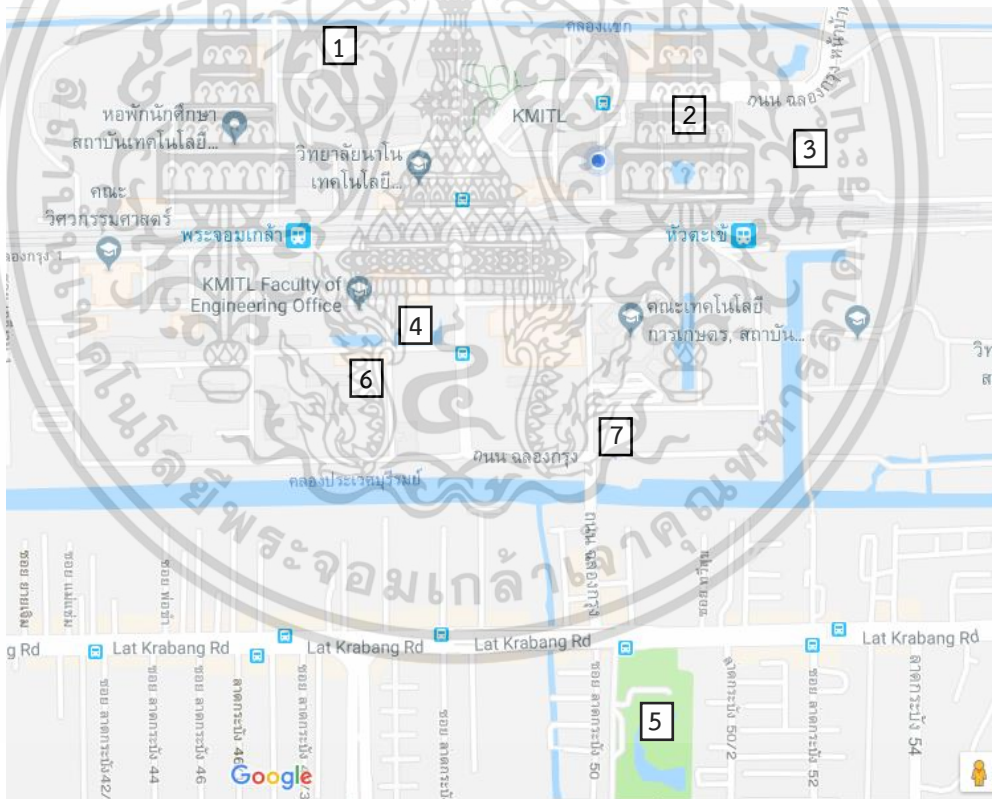
3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร ข้อมูลแสดงดังรูปที่ 3.1 และตารางที่ 3.1

ตัวอย่างดินเพาะปลูกทางการเกษตรจากแหล่งเพาะปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ สับปะรด ข้าวโพด แคนตาลูป ถั่วฝักยาว ข้าว ถั่วเหลือง และมันสำปะหลัง อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 3.1

เปลือกฝัก ได้รับคำแนะนำจากบริษัท เพอร์ซิเดนท์ เบเกอร์ จำกัด (มหาชน) นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร



รูปที่ 3.1 แผนที่ในการเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำบริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง: 1; สระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ; 2, สระน้ำหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตร; 3, สระน้ำที่แปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร; 4, สระน้ำบริเวณทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์; 5, สระน้ำที่สวนพระนคร; 6, สระน้ำที่คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์; 7, สระน้ำที่ร้านอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านวิชาการเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำและดินเพาะปลูกพืช

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	พิกัดในการเก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	
ตะกอนดิน ในแหล่งน้ำ	สระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ	13°43'52.5"N 100°46'34.2"E	16 ธันวาคม 2558
	สระน้ำหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตร	13°43'48.7"N 100°46'53.2"E	13 มกราคม 2559
	สระน้ำที่แปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร	13°43'46.8"N 100°47'02.3"E	13 มกราคม 2559
	สระน้ำบริเวณทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์	13°43'35.7"N 100°46'37.8"E	13 มกราคม 2559
	สระน้ำที่สวนพระนคร	13°43'15.8"N 100°46'52.0"E	20 มกราคม 2559
	สระน้ำที่คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์	13°43'33.9"N 100°46'35.5"E	13 มกราคม 2559
	สระน้ำที่โรงอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร	13°43'30.4"N 100°46'49.4"E	13 มกราคม 2559
ดินเพาะปลูกพืช	สับปะรด	19°25'21.1"N 99°44'02.7"E	16 เมษายน 2559
	ข้าวโพด	19°25'25.5"N 99°44'13.7"E	16 เมษายน 2559
	แคนตาลูป	19°25'27.8"N 99°44'05.1"E	16 เมษายน 2559
	ถั่วฝักยาว	19°25'28.2"N 99°44'07.6"E	16 เมษายน 2559
	ข้าว	19°24'10.7"N 99°45'10.9"E	17 เมษายน 2559
	ถั่วเหลือง	19°24'14.3"N 99°45'11.9"E	17 เมษายน 2559
	มันสำปะหลัง	19°24'17.9"N 99°45'14.9"E	17 เมษายน 2559

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Reinforced Clostridia Medium (RCM, Difco™) (ภาคผนวก ก) ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การคัดแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำและดินตามรายงานของ Al-Shorgani. *et al.* (2015) และใช้เก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส

อาหาร T6 (30% glucose) ซึ่งดัดแปลงจากอาหาร TYA (ภาคผนวก ก) ตามรายงานของ Ogata. *et al.* (1973) ใช้เพื่อทดสอบการผลิตอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (Acetone butanol ethanol, ABE)

อาหาร GYCC และ P2 (ภาคผนวก ก) ใช้เพื่อศึกษาความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิต ABE ของเชื้อที่ได้รับการคัดเลือก

3.1.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

Chemical reagent	Company
Paraffin oil	Sigma-aldrich, Germany
กลีเซอรอล (Glycerol)	Merck, Germany
แผ่นดัดออกซิเจน (Anaerocult® A)	Merck, Germany
Methylene blue	Unilab, Australia
Gram iodine	Merck, Germany
Safanin O	Merck, Germany
Malachite green	DC find Chemical, London
Sodium nitropruside	Merck, Germany
Sulfuric acid	QReC™, New Zealand
Acetone	Fisher Scientific, U.K.
Butanol	Sigma-aldrich, USA
Ethanol	Macron fine chemical™, U.S.A

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

Equipment	Company
เครื่องเก็บตัวอย่างน้ำแบบแนวขวาง	Water Sampler, Horizontal, Thailand
แวนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar)	Merck, Germany
เครื่องผสมสาร (Vortex)	รุ่น Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, U.S.A
โถดูดความชื้น (Desiccator)	รุ่น W/plast. Knob diameter 290 mm, Simax, North America
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	รุ่น UN110, Memmert, Germany
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)	รุ่น pH500, Clean, Taiwan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Equipment	Company
Anaerobic chamber	รุ่น White DG250 Anaerobic Work station, Don Whitley Scientific, England
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Hermle Z 383 K, Germany
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert WNB 45, Germany
ก๊าซไนโตรเจน 99.99%	Thonburiwattana, Thailand
ก๊าซผสม (10% H ₂ , 10% CO ₂ , 80% N ₂)	เอส.ไอ.เทคโนโลยี, Thailand
หม้อนึ่งอัตโนมัติ (Autoclave)	รุ่น ES-315, Tomy Seiko, Japan
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง	รุ่น BSA224S-CW, Sartorius, Germany
ออโต้ปิเปตต์ (Autopipettes)	รุ่น Discovery, Hight Tech Lab, Poland
เครื่อง HPLC	Shimadzu, Japan
ตัวกรองสารขนาดรู 0.22 ไมครอนเมตร	Minisart [®] , Sartorius Stedim Biotech, Germany
ชุดกรองสูญญากาศ	Whatman, England
กระดาษกรองสาร Cellulose Acetate	Sartorius stedim Biotech, Germany
ขนาดรู 0.20 ไมครอนเมตร	
เครื่องบด Retsch	รุ่น SK100, Germany

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำ

เก็บตัวอย่างตะกอนดินในน้ำนิ่งตามแหล่งธรรมชาติ (บึงขนาดเล็กหรือสระ) 7 แห่งๆ ละ 5 บริเวณ ที่ระดับความลึก 0.5 ถึง 1 เมตร ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างน้ำแบบแนวขวางขนาด 1 ลิตร รินใส่ขวดปริมาตร 60 มิลลิลิตร ให้เต็มขวด ปิดฝาให้สนิทแล้วพันด้วย Parafilm[®] เมื่อทำการเก็บตัวอย่างเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้นำตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCM ทันที

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในแปลงเพาะปลูกทางการเกษตรพืช 7 ชนิด ได้แก่ สับปะรด ข้าวโพด แคนตาลูป ถั่วฝักยาว ข้าว ถั่วเหลือง และมันสำปะหลัง ชนิดละ 5 หลุม ที่ระดับความลึก 0.5 เมตร แต่ละหลุมห่างกันอย่างน้อย 10 เมตร เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงซิปล็อคให้เต็มถุงและปิดให้สนิท จากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร (Montoya. *et al.*, 2000)

3.2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและสภาวะในการเจริญเติบโต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยการปิเปตตัวอย่างน้ำที่มีตะกอนดินหรือสารแขวนลอยของตัวอย่างดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเหลว RCM 5 มิลลิลิตร และปิดทับด้วย paraffin oil ที่ฆ่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแล้ว นำไป heat shock เพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที ที่ตั้งไว้นาน 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Abd-Alla *et al.*, 2015)

3.2.3 การแยกเชื้อ *Clostridium*

ถ่ายเชื้อที่เจริญเติบโตลงในเพลทอาหารแข็ง RCM ด้วยวิธีการ streak plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนอาหารที่มีเชื้อเจริญเติบโตมา 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการ streak เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ paraffin oil นำเพลทไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อในแต่ละเพลทเพื่อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยการแยกเชื้อจากการสังเกตลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี ความมันวาว ขนาด พื้นผิว และลักษณะขอบโคโลนี เป็นต้น โดยแยกเชื้อมา streak ลงบนเพลทอาหารแข็ง RCM แล้วนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นถ่ายเชื้อที่เจริญเติบโตลงในหลอดอาหารเหลว RCM แล้วปิดทับด้วย Paraffin oil ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำการถ่ายเชื้อจำนวน 2 ซ้ำ เพื่อนำไปใช้ในการคัดแยกเชื้อและเก็บเป็น stock เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากการคัดแยก ทำการ heat shock ด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อที่ได้เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งหมด แล้วนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะของเชื้อด้วยวิธีการย้อมแกรม (Gram stain) และย้อมเอ็นโดสปอร์ (endospore stain) (ภาคผนวก ข) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการคัดเลือกเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) สร้างสปอร์ และผลิตแก๊สในขณะเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป ถ้าหากตรวจสอบแล้วพบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์ให้ทำการแยกเชื้อด้วยวิธี streak plate อีกครั้งตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

ทำการคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตอะซิโตน โดยนำเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) เซลล์รูปท่อน (rod shaped cells) และสร้างสปอร์ มาเพาะเลี้ยงบนเพลทอาหารแข็ง T6 หรืออาหารเหลว T6 แล้วบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำมาทดสอบการผลิตอะซิโตน (Acetone test) โดยการหยด 5 เปอร์เซ็นต์ Sodium nitropruside 1 หยด บนเพลทเพาะเลี้ยงเชื้อหรือในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อตามด้วย Ammonium hydroxide 25 เปอร์เซ็นต์ 2-3 หยด ถ้าเชื้อมีการผลิตอะซิโตนจะทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงแดง (Calam, 1980)

3.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Clostridium* sp. ที่สามารถผลิต ABE ได้สูง

ถ่ายเชื้อที่มีการผลิตอะซิโตนจากหลอดที่เก็บเป็น stock ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว RCM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นทำการ Streak ลงบนเพลทอาหารแข็ง RCM แล้วบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 1 ลูบ ลงในหลอดอาหารเหลว T6 ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง (8 วัน) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Abd-Alla. *et al.*, 2014) โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ผลการวิจัยด้วยเครื่อง HPLC

ประเมินผลโดยเก็บรวบรวมผลการผลิต ABE ของไอโซเลตที่แยกได้ มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics V. 23 โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการผลิต ABE ได้สูง

นำเชื้อที่ได้รับการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว RCM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบนเพลทอาหารแข็ง RCM นำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และเก็บรักษาในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ (Al-Shorgani. *et al.*, 2016b) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.5 วิเคราะห์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic Analysis)

นำเชื้อที่มีความสามารถในการผลิต ABE มาทดสอบการเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร blood agar (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน หากตรวจพบโคโลนีที่สามารถเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดงได้ (อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองบริเวณที่เชื้อเจริญ) ให้ทำการฆ่าเชื้อด้วย autoclave ทันที

3.2.6 ระบุสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA

วิเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่ได้รับการคัดเลือกจากการประเมินผลการผลิต ABE สูงที่สุดสองลำดับ ด้วยการสกัดดีเอ็นเอและทำจีโนมิกให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์และระบุสายพันธุ์

3.2.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

โดยการใช้ชุดสกัด Presto™ Mini gDNA Bacteria kit (Geneaid, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้ เตรียมตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างเชื้อ 1 ลูบ ใส่ในสารละลาย G+ buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วเติม G+ buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเติม Lysozyme ปริมาตร 0.8 มิลลิกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในระหว่างบ่มนั้นทำการกลับหลอดทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วนำมาเติมเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการกลับหลอดทุก 3 นาที จากนั้นทำการ lysis โดยการเติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการกลับหลอดทุก 3 นาที พร้อมกับการทำการบ่ม Elution Buffer (pre-heat) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอน Elution เมื่อบ่มเสร็จแล้วนำมากำจัด RNA โดยการเติมเอนไซม์ Rnase A ปริมาตร 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ต่อไปเข้าสู่ขั้นตอน DNA Binding โดยการเติมเอทานอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ใน GD column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการล้าง DNA โดยการเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใน GD column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และทำการปั่นเหวี่ยงหลอด GD column เปล่าอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เข้าสู่ขั้นตอน elution โดยการเติม pre-heated Elution buffer 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกรอบที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อชะ DNA ให้บริสุทธิ์ จึงได้เป็น Genomic DNA

3.2.6.2 การทดสอบจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 มาวิเคราะห์ในอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายในบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) pH 0.8 (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยการให้ความร้อนจากไมโครเวฟ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเทเจลลงในถาดเจล (Gel chamber) ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และทำการผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6x Loading dye (ภาคผนวก ค) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยใช้ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ให้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำเจลมาข้อมด้วยสารละลายเอติเดียมโบโรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene genious; Bio Imaging System)

3.2.6.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) สำหรับดีเอ็นเอ และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับโปรตีน (Cseke *et al.*, 2004) พิจารณาคุณภาพของดีเอ็นเอได้จากค่า A_{260}/A_{280} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอหลังจากการสกัด ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-2 (Sambrook *et al.* 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.6.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เครื่อง PCR-thermal cycle (Biometra, Germany) และใช้ชุด universal primer คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ขนาน 20 bp และ 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') ขนาน 19 bp (Lane. *et al.*, 1985) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณเป้าหมาย โดยมีปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตรต่อ 1 reaction ส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.1 (PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer, New England Biolabs[®] inc)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x EF-Taq reaction buffer	2.5	1x
10 mM dNTP	0.5	0.2 mM
10 μ M Primer 27F	0.5	0.2 μ M
10 μ M Primer 1492R	0.5	0.2 μ M
5 U/ μ L EF-Taq DNA polymerase	0.125	0.025 U
100 ng/ μ L DNA template	2	
น้ำกลั่น	18.875	
รวม	25	

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.1 ในการทำพีซีอาร์แต่ละครั้งจะทำการผสมส่วนประกอบทั้งหมด (Master mixture) ลงในหลอดเดียวกันในปริมาณที่พอเพียงกับจำนวนตัวอย่างก่อนยกเว้นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วจึงแบ่งใส่หลอดพีซีอาร์ในแต่ละหลอด จากนั้นจึงเติมดีเอ็นเอต้นแบบของแต่ละตัวอย่างลงไป นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอน ดังต่อไปนี้

- 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์
- 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาทีเพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว
- 3) Primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อทำให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์ได้อย่างเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 4) Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาทีเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทป์จากการจับตัวกันกับตัวอย่างที่เหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ

โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา (Final extension) ให้คงไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (hold)

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis; Gel Mate 2000) ดังหัวข้อที่ 3.2.8.2 และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ที่บริษัท Bioneer ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ 4 primer ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), 518F (5' CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3') และ 800R (5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3')

3.2.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

นำลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน 16S rRNA ที่ได้รับจากการส่งวิเคราะห์มาทำการตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0.9.0 มีขั้นตอนดังนี้

ทำการเปิดโปรแกรม BioEdit แล้วจึงเปิดไฟล์ (.txt) ของลำดับนิวคลีโอไทป์ 27F และ 518F เพื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ระหว่างเส้น Forward โดยเปิด Accessory Application และเลือก ClustalW Multiple alignment หลังจากนั้น มีหน้าต่างโปรแกรม ClustalW Options ขึ้นมา เลือก Full Multiple alignment และ Bootstrap NJ Tree ที่ 1000 ครั้ง เลือก Run ClustalW และการตัดแต่งลำดับนิวคลีโอไทป์ จากนั้นทำการรวมลำดับนิวคลีโอไทป์ของทั้งสองเส้นโดยการคลิกที่ Alignment เลือก Create Consensus Sequence จะได้ลำดับนิวคลีโอไทป์ใหม่ขึ้นมาอีก 1 เส้น ทำการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์เส้นใหม่ใน Notepad โดยการคลิกที่ชื่อของลำดับนิวคลีโอไทป์ จากนั้นคลิก Edit เลือก Copy Sequence to clipboard (Fasta Format) แล้วนำไปวางใน Notepad และทำการบันทึกข้อมูล

ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทป์ 800R และ 1492R ต้องทำการกลับลำดับนิวคลีโอไทป์ก่อน โดยการเปิดไฟล์ (.txt) ของลำดับนิวคลีโอไทป์ทั้งสองในโปรแกรม BioEdit เลือก Sequence เลือก Nucleic Acid เลือก Reverse Complement และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ระหว่างเส้น Reverse ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนกันกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ระหว่างเส้น Forward จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทป์เส้น Forward และ Reverse มารวมกัน โดยวิธีการเหมือนกันกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ดังอธิบายไว้ข้างต้น

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทป์แล้วจึงนำมาวิเคราะห์หาสายพันธุ์และความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทป์จากฐานข้อมูล Blast ที่เว็บไซต์ NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> จากนั้นทำการบันทึกไฟล์ Fasta ของแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกับ *Clostridium* spp. เพื่อมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree แบบ Neighbor-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0.21 มีขั้นตอนดังนี้

เปิดไฟล์ (.txt) ของลำดับนิวคลีโอไทป์ทั้งหมดในโปรแกรม BioEdit คลิกที่ Accessory Application และเลือก ClustalW Multiple alignment หลังจากนั้นก็มีหน้าต่างโปรแกรม ClustalW Options ขึ้นมา คลิกเลือก Full Multiple alignment และ Bootstrap NJ Tree ที่ 1000 ครั้ง คลิก Run ClustalW และทำการบันทึกเป็นไฟล์ Fasta (.fas) จากนั้นเปิดไฟล์ Fasta ในโปรแกรม MEGA 7 เลือก Nucleotide Sequence เลือก Standard จากนั้นทำการบันทึกไฟล์ MEGA (.meg) โดยการคลิก File เลือก Convert File Format to MEGA ทำการเลือกไฟล์และบันทึกไฟล์ (.meg) หลังจากนั้นทำการสร้าง Phylogenetic tree แบบ Neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) โดยการคลิกที่ Phylogeny เลือก Construct/Test Neighbor-Joining Tree ตั้งค่า Bootstrap เป็น 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) เลือกข้อมูลใน Model/method เป็น Maximum Composite Likelihood (Tamura. et al., 2004) เลือก d: Transitions + Transversions ในหัวข้อ Rates and Patterns เลือก Uniform rates และ Same (Homogeneous) และในหัวข้อ Data Subset to Use เลือก Complete deletion จากนั้นกด compute และทำการบันทึกไฟล์ของ Phylogenetic tree ที่ได้

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ในฐานข้อมูล EzBioCloud ที่เว็บไซต์ <https://www.ezbiocloud.net/identify> โดยการคลิกแถบเมนู IDENTIFY จากนั้นคลิกที่ Identify single sequence เพื่อใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อที่คัดแยกได้ลงในช่อง 16S rRNA Sequence พร้อมกับการตั้งชื่อ Sequence ในช่อง Sequence Name จากนั้นกด Next จะได้หน้าต่างแสดงความยาวของลำดับนิวคลีโอไทป์ และทำการ submit ข้อมูล เพื่อนำไปเปรียบเทียบความใกล้เคียงบริเวณยีน 16S rRNA ของเชื้อที่คัดแยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทป์ของ *Clostridium* sp. ใน EzBioCloud

ทำการจัดเก็บลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 ที่คัดแยกได้ ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมี accession number ได้แก่ MG674699.1 และ MG674690.1 ตามลำดับ

3.2.8 การศึกษาลักษณะฟิโนไทป์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

นำเชื้อ *Clostridium* spp. ได้รับการคัดเลือกจากการประเมินผลการผลิต ABE สูงที่สุด 2 ลำดับมาทำการ streak บนเพลทอาหารแห้ง RCM ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ในการจัดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำแนกลักษณะทางพีโนไทป์และทดสอบทางชีวเคมี ตามคุณสมบัติที่ระบุไว้ในไว้ใน Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Vos. *et al.*, 2009) โดยทำการทดสอบ ดังนี้

3.2.8.1 ทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มี Phenol red เป็น pH indicator (ภาคผนวก ก) และมีองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ อะราบินอส (arabinose) ไชโลส (xylose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) แซคคาโรส (saccharose) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methylglucopyranoside) เดกซ์ทริน (dextrin) ไรโบส (ribose) กลีเซอรอล (glycerol) ดัลซิทอล (dulcital) อะราบิทอล (L-arabitol) อินอซิทอล (inositol) แมนนิทอล (mannitol) ซอร์บิทอล (sorbitol) เมเลไซโตส (Melezitose) แรมโนส (rhamnose) ทูรานอส (turanose) อินนูลิน (inulin) เพกติน (pectin) และทรีฮาโลส (trehalose) ก่อนลงเชื้ออาหารมีสีส้ม และใส่หลอด Durham คั่ว อยู่ในหลอดทดลองเพื่อทดสอบการผลิตก๊าซ ทำการทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของ เชื้อที่คัดแยกได้ โดยการใส่ลูปถ่ายเชื้อจากเพลทอาหารแข็ง RCM ลงในหลอดอาหารเหลวที่มีแหล่ง คาร์บอนชนิดต่างๆ และปิดทับด้วย paraffin oil ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน แล้วนำมาอ่านผล

ผลบวก (+) คืออาหารที่ใช้ทดสอบเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อ สามารถย่อยแหล่งคาร์บอนในหลอดได้ และถ้ามีช่องว่างในหลอด Durham แสดงว่าการหมักนั้นให้ ก๊าซด้วย (+) ถ้าไม่มีช่องว่างในหลอด Durham แสดงว่าการหมักนั้นไม่มีก๊าซเกิดขึ้น (-)

ผลลบ (-) คืออาหารที่ใช้ทดสอบเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อ ไม่สามารถใช้น้ำตาลในหลอดทดสอบนั้น

3.2.8.2 ทดสอบการย่อยแป้ง (starch)

ทำการถ่ายเชื้อที่จะทดสอบโดยการ streak บนอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก) ที่มี starch solution 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน วิเคราะห์ผลด้วยการหยด สารละลาย Lugals' iodine ลงบนผิวหน้าอาหาร (Holdeman, 1977) และสังเกตผลรอบโคโลนี

ผลบวก (+) คือไม่เปลี่ยนสี

ผลลบ (-) คือเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

3.2.8.3 ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ Catalase

ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ Catalase โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เชื้อเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากเพลทอาหารแข็ง RCM บ้ายลงบนสไลด์ จากนั้นหยดสารละลาย H₂O₂ 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น (Cappuccino and Sherman, 2001)

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นฟองก๊าซ (O₂) แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์

Catalase ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลลบ (-) คือไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

3.2.8.4 ทดสอบการเคลื่อนที่ของ *Clostridium*

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วแทง (stab) ลงในหลอดอาหารอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก) เป็นแนวตั้งและยกเข็มเขี่ยเชื้อออกจากอาหารในแนวเดิมซึ่งในอาหารมีวุ้นเป็นองค์ประกอบ 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (Holdeman, 1977)

ผลบวก (+) คือสังเกตเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นทั้งหลอด ไม่เห็นรอย stab เชื้อในอาหาร

ผลลบ (-) คือเห็นรอย stab เชื้อเป็นแนวขุ่นชัดเจน รอบๆ รอยที่ stab เชื้อลงไปจะใส

3.2.8.5 ทดสอบสารอินโดล (Indole test)

ทดสอบสารอินโดลโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากเพลทอาหารแข็ง RCM ลงในอาหาร Tryptone broth (HiMedia[®], India) ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่มีทริพโตแฟนผสมอยู่ โดยก่อนลงเชื้ออาหารมีลักษณะสีเหลืองใส นำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน วิเคราะห์ผลโดยการหยด Kovac's reagent (ภาคผนวก ค) 5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตการณ์เปลี่ยนสีของ Kovac's reagent ที่แยกชั้นอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ (Barrow, 1993)

ผลบวก (+) คือเกิดวงแหวนสีม่วงแดงในชั้นของ Kovac's reagent เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลลบ (-) คือเกิดวงแหวนสีเหลืองอ่อนในชั้นของ Kovac's reagent เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.8.6 ทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแต่ละเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วแทง (stab) ลงในหลอดอาหาร nutrient gelatin (ภาคผนวก ก) ในแนวตั้ง นำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน บันทึกผลโดยการสังเกตการย่อยเจลาตินในอาหาร nutrient gelatin โดยนำไปแช่ในตู้เย็นที่ -4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนสังเกตการย่อยเจลาติน (Smith and Goodner, 1958)

ผลบวก (+) คือถ้าเกิดการย่อยเจลาตินอาหารจะเหลว

ผลลบ (-) คือถ้าไม่เกิดการย่อยเจลาตินอาหารจะยังคงแข็งเหมือนเดิม

3.2.8.7 ทดสอบ Nitrate reduction

เพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว Nitrate broth (HiMedia[®], India) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน มาทำการทดสอบ Nitrate reduction โดยการใช้ standard nitrite reduction test ซึ่งประกอบด้วย nitrate reduction reagent A (sulfanilic acid) เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ใน 5 N acetic acid) และ nitrate reduction reagent B (N,N-dimethyl-L-naphthylamine 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ใน 5 N acetic acid) และใช้ 12 mM NO₂ เป็นตัวควบคุมในการทดสอบ จากนั้นทำการทดสอบการ reduce nitrate โดยการหยด reagent A ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ reagent B ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บันทึกผลโดยการสังเกต การเกิดสีม่วงภายใน 5 นาที (Cappuccino and Sherman, 2001)

ผลบวก (+) คือ สังเกตเห็นสีม่วงเกิดขึ้น แสดงว่าไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์
ผลลบ (-) คือ ไม่มีสีม่วงเกิดขึ้น

3.2.9 สภาพของกระบวนการหมัก

ในขั้นตอนการหาสภาพของกระบวนการหมักได้ทำการเตรียมหัวเชื้อปริมาณ 1 ลูก ลงในอาหาร T6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด (450 มิลลิลิตร) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารอยู่ 405 มิลลิลิตร ทุกการทดลองจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มใน anaerobic chamber ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง (7 วัน) ในการหมักแต่ละ ครั้งได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 1 วัน

3.2.9.1 การทดสอบความสามารถในการผลิต ABE ของ *Clostridium* spp. ในอาหารที่ แตกต่างกัน

ศึกษาความสามารถในการผลิต ABE ของเชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกใน อาหารที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ อาหาร RCM, T6, GYCC และ P2 medium ที่ระดับความเข้มข้น ของกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร โดยองค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิดและวิธีการเตรียมได้อธิบายไว้ดัง ภาคผนวก ก ซึ่งสูตรอาหารที่ให้ผลผลิต ABE มากที่สุด จะได้รับการคัดเลือกในการศึกษาขั้นตอน ต่อไป

3.2.9.2 การหา pH เริ่มต้น (initial pH) ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก ABE (ดัดแปลง วิธีการของ Madihah. *et al.*, 2008)

ศึกษาความสามารถในการผลิต ABE โดยการควบคุมค่า pH เริ่มต้นที่ pH 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ในสูตรอาหารที่ได้รับการคัดเลือกจากหัวข้อที่ 3.2.9.1 ซึ่งค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมใน การผลิต ABE ได้ดีที่สุดจะได้รับการคัดเลือกในการศึกษาต่อไป

3.2.9.3 การทดสอบความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิต ABE ดัดแปลงวิธีการ ของ Al-Shorgani. *et al.* (2015)

ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของความเข้มข้นกลูโคสโดยใช้สูตรอาหารและค่า pH เริ่มต้นที่ได้รับการคัดเลือกจากหัวข้อที่ 3.2.9.1 และ 3.2.9.2 ให้มีความเข้มข้นของกลูโคสในอาหาร เป็น 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร (ฆ่าเชื้อกลูโคสแยกกับอาหาร) ซึ่งความเข้มข้นกลูโคสที่ เหมาะสมในการผลิต ABE ได้ดีที่สุดจะได้รับการคัดเลือกในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.10 การใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก

3.2.10.1 กระบวนการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์

นำเปลือกเผือกที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เพอร์ซิเดนท์ เบเกอร์ จำกัด (มหาชน) นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร มาอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด Retsch รุ่น SK100 นำผงเปลือกเผือกที่ได้มาร่อนด้วยตะแกรงร่อนขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร และเก็บรักษาในโถดูดความชื้น (Desiccator) ทำการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ตามวิธีการของสิริมาและคณะ (2558) โดยการชั่งเปลือกเผือกที่ผ่านการร่อนแล้วปริมาณ 60 กรัมต่อน้ำ 400 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Duran® ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนประมาณ 30 นาที ด้วยไฟอ่อนๆ เพื่อเป็นการเจลาตีไนซ์แป้ง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วให้ลดอุณหภูมิลงอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส เพื่อเติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3.30 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จากนั้นลดอุณหภูมิให้เหลือ 50 องศาเซลเซียส เพื่อเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส 0.015 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 13.30 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำเปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยแล้วมากรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง Whatman No.1 จึงสามารถนำส่วนใสไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และใช้ในการเตรียมอาหารเพื่อกระบวนการหมักต่อไป

3.2.10.2 กระบวนการหมักเพื่อผลิต ABE

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* spp. ในอาหารสูตร T6 ซึ่งเป็นอาหารที่ได้รับการคัดเลือกจากหัวข้อ 3.2.9.1 โดยใช้ส่วนใสที่ได้จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์มาใช้เป็นสารละลายแทนน้ำกลั่นในขั้นตอนการเตรียมอาหาร ทำการถ่ายหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด (450 มิลลิลิตร) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ซึ่งอยู่ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 3 ข้ำ และเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน

3.3 การวิเคราะห์ผลการวิจัย

สารละลายที่ได้จากการหมักในทุกขั้นตอนถูกมาหาความเข้มข้นของเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น UV-1800 (Shimadzu, Japan) (Cai. *et al.*, 2013) จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลื่อมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที (Al-Shorgani. *et al.*, 2016a) และเก็บส่วนใสมาริเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS (Miller, 1959) วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter รุ่น pH 500

pH/mV/TEMP meter (First Clean Corporation, La Puente) และวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ทั้งหมดโดยใช้ ABE ด้วยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

3.3.1 ความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ทั้งหมดโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography; HPLC) รุ่น LC-20A (Shimadzu, Japan) ประมวลผลด้วยโปรแกรม LCsolution โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางด้วยสารละลายกรดซิดริก 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ในอัตราส่วนสารตัวอย่างต่อกรดซิดริก เท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร ให้ได้ปริมาตร 1 ถึง 1.5 มิลลิลิตรแล้วดูดใส่ขวด (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้คอลัมน์ Aminex[®] Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร และอุณหภูมิคอลัมน์ (column oven) อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งมีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 1100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับการใช้ Refractive index detector (RI detector) ซึ่งเป็นการวัดการหักเหแสงของสาร และ run time นาน 30 นาที จากนั้นวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารต่างๆ โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟที่มี Retention time เดียวกันมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้ทำการวิเคราะห์ไว้ก่อนหน้าแล้ว ดังภาคผนวก ค

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตัวอย่างที่เก็บจากกระบวนการหมักตั้งแต่เวลาเริ่มต้นจนครบวันที่ 7 ของการหมัก ถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี DNS (3,5-dinitrosalicylic) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959) (ภาคผนวก ค) โดยการใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง เขย่าสารให้เข้ากัน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น UV-1800 (Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างหรือคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การคำนวณค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity)

ผลได้ (yield) คำนวณได้จากผลผลิตที่ได้จากการหมักต่อสารตั้งต้นที่ใช้ไป ดังสมการ

$$\text{ผลได้ (yield) (กรัมต่อกรัม)} = \frac{A-B}{C-D}$$

A คือความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ผลิตได้มากที่สุด

B คือความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เวลาเริ่มต้น

C คือความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือของวันที่ผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด

D คือความเข้มข้นของกลูโคสที่เวลาเริ่มต้น

ค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) คำนวณได้จากผลผลิตที่ได้จากการหมักต่อระยะเวลาในการหมัก ดังสมการ

$$\text{ค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{A-B}{h}$$

A คือความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ผลิตได้มากที่สุด

B คือความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เวลาเริ่มต้น

h คือระยะเวลาที่ผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด

3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

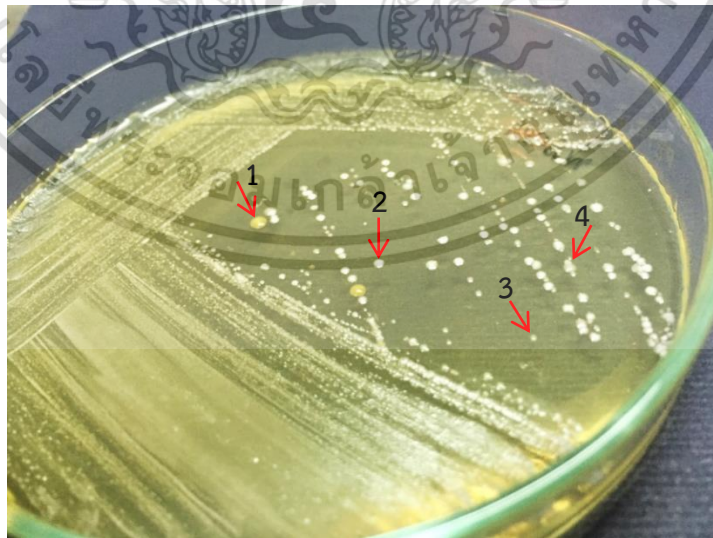
นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ผลการผลิต ABE และเปรียบเทียบค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ที่ได้จากการทดลอง มาวิเคราะห์ด้วยการคำนวณทางสถิติ เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics V. 23 โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิต ABE

เชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกจากตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่ง บริเวณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้แก่ สระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ สระน้ำหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตร สระน้ำที่แปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร สระน้ำบริเวณทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์ สระน้ำที่สวนพระนคร สระน้ำที่คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์ และสระน้ำที่โรงอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร และคัดแยกจากตัวอย่างดินเพาะปลูกทางการเกษตร ได้แก่ สับปะรด ข้าวโพด แคนตาลูป ถั่วฝักยาว ข้าว ถั่วเหลือง และมันสำปะหลัง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร RCM ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 410 ไอโซเลต จากการสังเกตลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี ความขุ่น ลักษณะขอบ ความโปร่งแสง และขนาด เป็นต้น ตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 4.1 หมายเลข 1 โคโลนีมีลักษณะเป็นสีเหลือง มันวาว และขอบเรียบ ส่วนโคโลนีหมายเลข 2 มีลักษณะเป็นสีขาว ทึบแสง มันวาว และขอบเรียบ ในขณะที่หมายเลข 3 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว โปร่งแสง และมีขนาดเล็ก และหมายเลข 4 โคโลนีมีลักษณะเป็นสีขาว มันวาว และโปร่งแสง ซึ่งโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละเพลทนั้นถูกนำไป streak ใหม่อีกครั้งบนอาหาร RCM เพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความบริสุทธิ์ หลังจากนั้นได้นำไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้ (410 ไอโซเลต) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCM และปิดทับผิวหน้าอาหารด้วย paraffin oil เพื่อให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าจากจุลินทรีย์ทั้งหมด 410 ไอโซเลต มีเพียง 220



รูปที่ 4.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้จากตะกอนดินในสระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ บนเพลทอาหารแข็ง RCM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตก๊าซ สังเกตได้จากการเกิดฟองอากาศบริเวณผิวหน้าของ paraffin oil เซลล์มีลักษณะเป็นรูปท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ และย้อมติดสีแกรมบวก จากปริมาณ ไอโซเลตทั้งหมด 220 ไอโซเลต ที่มีความเป็นไปได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ในจิ้นัส *Clostridium* ถูกคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกสับปะรดมากที่สุด 29 ไอโซเลต รองลงมาคือดินเพาะปลูกแคนตาลูปซึ่งคัดแยกเชื้อได้ปริมาณเท่ากับตะกอนดินในน้ำแหล่งที่ 7 คือ 24 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และเมื่อนำ ไอโซเลตทั้ง 220 ไอโซเลต มาทดสอบการผลิตอะซิโตน พบว่ามีเพียง 126 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตอะซิโตนได้ หลังจากนั้นจึงได้นำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอะซิโตนมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน และวิเคราะห์ผลการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (acetone butanol ethanol, ABE) ด้วย HPLC เห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลนั้นมีทั้งหมด 94 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.2) คิดเป็น 22.93 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้ และ 74.60 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตอะซิโตน ซึ่งจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลนั้นพบได้มากที่สุดที่ดินเพาะปลูกสับปะรด (28 ไอโซเลต) รองลงมาคือตะกอนดินในน้ำแหล่งที่ 6 แหล่งที่ 7 และดินเพาะปลูกมันสำปะหลัง (15, 14 และ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ) สำหรับตัวอย่างตะกอนดินในแหล่งน้ำแหล่งที่ 5 และดินเพาะปลูกข้าวไม่พบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตบิวทานอล (จากไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้คือ 35 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ)

ข้อมูลในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการผลิตบิวทานอลของจุลินทรีย์ทั้ง 94 ไอโซเลต เห็นได้ว่าจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้ตั้งแต่ 0.01 จนถึง 5.89 กรัมต่อลิตร และผลิตตัวทำละลายทั้งหมด 0.58 จนถึง 8.48 กรัมต่อลิตร โดยที่ไอโซเลต G10 สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดคือ 5.89 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.06 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.52 กรัมต่อลิตร) ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินในน้ำแหล่งที่ 1 รองลงมาคือไอโซเลต H5 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 2.39 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 3.74 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.76 กรัมต่อลิตร) ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินในน้ำแหล่งที่ 3 และมีเพียง 5 ไอโซเลตจากทั้งหมด 94 ไอโซเลต ที่ผลิตบิวทานอลได้ 1.43 ถึง 5.89 กรัมต่อลิตร คือไอโซเลต M12, G6, H1, H5 และ G10 ส่วนที่เหลืออีก 79 ไอโซเลต สามารถผลิตบิวทานอลได้น้อยกว่า 1 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้มากที่สุดที่ดินเพาะปลูกสับปะรด แต่พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงนั้น คัดแยกได้จากตะกอนดินในน้ำแหล่งที่ 1 ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายได้สูงกับแหล่งเพาะปลูกพืชหรือตะกอนดินในแหล่งน้ำ ซึ่งสอดคล้องกันกับ Montoya *et al.* (2000) รายงานว่าสามารถแยกเชื้อ *Clostridia* ได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลต จากดินที่เพาะปลูกหญ้า อ้อย พืชตระกูลถั่ว และฝ้าย 28, 24, 25 และ 19 ไอโซเลต ตามลำดับ ในขณะที่ ดินที่เพาะปลูกมะม่วง อะโวคาโด กล้วย น้ำเต้า ข้าวโพด กะหล่ำปลี และหัวหอม คัดแยกเชื้อได้น้อยกว่า 3 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.1 แหล่งเก็บตัวอย่างและจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในเบื้องต้น

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	จำนวน ตัวอย่าง	ไอโซเลต ทั้งหมด	การคัดแยก เบื้องต้น*	การทดสอบ อะซิโตน	สามารถผลิต บิวทานอล	
ตะกอนดิน ในแหล่งน้ำ**	สระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ	5	48	8	11	8
	สระน้ำหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตร	5	46	11	6	4
	สระน้ำที่แปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร	5	23	19	6	6
	สระน้ำทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์	5	21	13	7	2
	สระน้ำที่สวนพระนคร	5	34	2	2	0
	สระน้ำคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์6	5	35	21	19	15
	สระน้ำโรงอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตร	5	45	24	17	14
ดิน เพาะปลูกพืช	สับปะรด	5	36	29	28	28
	ข้าวโพด	5	31	19	4	1
	แคนตาลูป	5	35	24	5	1
	ถั่วฝักยาว	5	29	20	3	3
	ข้าว	5	5	4	2	0
	ถั่วเหลือง	5	8	5	5	2
	มันสำปะหลัง	5	14	11	11	10
จำนวนทั้งหมด	70	410	220	126	94	

หมายเหตุ : *การคัดแยกเบื้องต้น คือการสังเกตจากความสามารถในการผลิตแก๊ส เซลล์รูปท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก และการสร้างสปอร์

แต่เชื้อที่สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกข้าว คือ 11.4 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 25.2 กรัมต่อลิตร

Chua. *et al.* (2013) ได้รายงานความสามารถในการผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* strain G117 ซึ่งคัดแยกได้จากดินในทุ่งหญ้าในประเทศสิงคโปร์ พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงถึง 13.50 กรัมต่อลิตร ในปีเดียวกันนี้ Panitz. *et al.* (2013) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์ GT6 จากตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่ง และมีความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอลได้ถึง 11.5 กรัมต่อลิตร จากกลีเซอรอล 30 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลิต ABE ได้ 14 กรัมต่อลิตร ในปีต่อมา Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* ที่สามารถตัวทำละลายได้ จากดินเพาะปลูกพืชทางการเกษตร ในเมือง Assiut ประเทศ Egypt ทั้งหมด 107 ไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว T6 พบว่ามีเพียง 80 ไอโซเลตสามารถผลิต ABE ได้ระหว่าง 0.036 ถึง 31.89 กรัมต่อลิตร โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เพาะปลูกมันฝรั่งทั้งหมด 27 ไอโซเลต ตามด้วยตัวอย่างดินเพาะปลูกข้าวสาลี 18 ไอโซเลต และจากตัวอย่างดินเพาะปลูกหัวหอม 10 ไอโซเลต แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดถูกคัดแยกได้จากดินเพาะปลูกพืชตระกูลถั่ว คือ *C. roseum* ASU58 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงถึง 16.77 กรัมต่อลิตร และ ABE 29.81 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 10.34 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 2.70 กรัมต่อลิตร) และ Al-Shorgani. *et al.* (2016a) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 จากดินที่เพาะปลูกข้าว ในประเทศมาเลเซีย ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้ 7.27 กรัมต่อลิตร และ ABE 10.22 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.31 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.64 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ไอโซเลต	แหล่งตัวอย่างที่วิจัย	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 (กรัมต่อลิตร)			
		อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ตัวทำละลายรวม
G1	แหล่งที่ 1	2.11	0.23	4.49	6.82
G2	แหล่งที่ 1	1.82	0.19	4.57	6.58
G3	แหล่งที่ 1	1.95	0.29	2.07	4.31
G4	แหล่งที่ 1	2.53	0.62	4.15	7.30
G5	แหล่งที่ 1	2.21	0.43	6.23	8.86
G6	แหล่งที่ 1	1.44	1.73	0.51	3.68
G8	แหล่งที่ 1	1.71	0.34	1.48	3.53
G10	แหล่งที่ 1	2.06	5.89	0.52	8.48
H1	แหล่งที่ 2	5.00	2.11	0.55	7.65
H2	แหล่งที่ 2	2.81	0.23	0.75	3.79
H3	แหล่งที่ 2	2.23	0.17	0.55	2.95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และห้ามการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ไอโซเลต	แหล่งตัวอย่างที่วิจัย	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 (กรัมต่อลิตร)			
		อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ตัวทำละลายรวม
H4	แหล่งที่ 2	0.94	0.17	1.01	2.11
H5	แหล่งที่ 3	3.74	2.39	0.76	6.90
H6	แหล่งที่ 3	0.09	0.06	0.78	0.94
H7	แหล่งที่ 3	2.61	0.34	0.90	3.85
H8	แหล่งที่ 3	4.10	0.23	0.77	5.10
H9	แหล่งที่ 3	0.11	0.06	0.33	0.49
H10	แหล่งที่ 3	1.44	0.16	0.93	2.54
K4	แหล่งที่ 4	1.89	0.16	1.96	4.00
K5	แหล่งที่ 4	2.90	0.06	1.47	4.43
L1	แหล่งที่ 6	0.30	0.08	1.00	1.37
L2	แหล่งที่ 6	0.18	0.04	0.50	0.71
L3	แหล่งที่ 6	0.41	0.07	0.44	0.92
L4	แหล่งที่ 6	0.10	0.03	0.68	0.81
L5	แหล่งที่ 6	0.26	0.05	0.72	1.03
L6	แหล่งที่ 6	0.39	0.06	0.66	1.11
L7	แหล่งที่ 6	0.87	0.07	0.51	1.45
L11	แหล่งที่ 6	2.12	0.14	0.61	2.87
L12	แหล่งที่ 6	0.54	0.05	0.56	1.15
L13	แหล่งที่ 6	0.84	0.07	0.65	1.56
L14	แหล่งที่ 6	0.86	0.07	0.26	1.19
L16	แหล่งที่ 6	1.51	0.09	0.35	1.95
L18	แหล่งที่ 6	0.51	0.07	0.70	1.28
L19	แหล่งที่ 6	1.14	0.15	0.69	1.98
L20	แหล่งที่ 6	1.79	0.20	0.85	2.83
M1	แหล่งที่ 7	0.92	0.07	0.56	1.55
M2	แหล่งที่ 7	0.52	0.05	0.62	1.19
M3	แหล่งที่ 7	0.46	0.05	0.71	1.22
M4	แหล่งที่ 7	1.84	0.03	0.11	1.97
M5	แหล่งที่ 7	0.94	0.01	0.09	1.04
M6	แหล่งที่ 7	1.53	0.14	0.49	2.15
M7	แหล่งที่ 7	1.18	0.17	0.58	1.93
M8	แหล่งที่ 7	0.46	0.04	0.62	1.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ไอโซเลต	แหล่งตัวอย่างที่วิจัย	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 (กรัมต่อลิตร)			
		อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ตัวทำละลายรวม
M9	แหล่งที่ 7	1.72	0.10	0.63	2.45
M11	แหล่งที่ 7	1.01	0.23	0.76	2.00
M12	แหล่งที่ 7	3.55	1.43	1.16	6.15
M14	แหล่งที่ 7	0.78	0.06	0.46	1.30
M15	แหล่งที่ 7	0.79	0.08	1.13	2.00
M16	แหล่งที่ 7	0.76	0.08	0.73	1.57
P1	สับปะรด	1.22	0.06	0.14	1.43
P2	สับปะรด	1.32	0.12	0.18	1.61
P3	สับปะรด	1.23	0.05	0.13	1.42
P4	สับปะรด	1.20	0.04	0.12	1.36
P5	สับปะรด	1.07	0.08	0.15	1.30
P6	สับปะรด	1.18	0.07	0.15	1.40
P7	สับปะรด	1.47	0.11	0.17	1.74
P8	สับปะรด	2.26	0.45	0.30	3.00
P9	สับปะรด	1.53	0.25	0.32	2.11
P10	สับปะรด	0.45	0.01	0.12	0.58
P12	สับปะรด	0.90	0.08	0.18	1.15
P13	สับปะรด	1.00	0.06	0.20	1.26
P14	สับปะรด	1.18	0.06	0.11	1.34
P15	สับปะรด	5.33	0.07	0.10	5.50
P16	สับปะรด	1.87	0.15	0.21	2.22
P17	สับปะรด	0.97	0.06	0.18	1.22
P18	สับปะรด	0.86	0.06	0.17	1.10
P19	สับปะรด	1.01	0.05	0.15	1.21
P20	สับปะรด	1.29	0.04	0.15	1.49
P21	สับปะรด	1.20	0.10	0.19	1.49
P22	สับปะรด	1.85	0.28	0.25	2.38
P23	สับปะรด	1.09	0.05	0.12	1.26
P24	สับปะรด	1.56	0.44	0.17	2.18
P25	สับปะรด	1.07	0.08	0.13	1.29
P26	สับปะรด	1.27	0.06	0.10	1.43
P27	สับปะรด	1.53	0.06	0.10	1.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ไอโซเลต	แหล่งตัวอย่างที่วิจัย	ความเข้มข้นตัวทำละลายในอาหาร T6 (กรัมต่อลิตร)			
		อะซิโตน	บิวทานอล	เอทานอล	ตัวทำละลายรวม
P28	สับปะรด	1.24	0.04	0.10	1.38
P29	สับปะรด	1.21	0.09	0.15	1.46
Q5	ข้าวโพด	0.52	0.06	0.74	1.32
R1	แคนตาลูป	0.95	0.06	0.28	1.19
S1	ถั่วฝักยาว	1.16	0.06	0.06	1.50
S2	ถั่วฝักยาว	0.63	0.03	0.06	0.71
S3	ถั่วฝักยาว	0.31	0.01	0.15	0.39
U1	ถั่วเหลือง	2.09	0.18	0.20	2.48
U2	ถั่วเหลือง	1.25	0.50	0.18	1.93
T1	มันสำปะหลัง	0.65	0.05	0.17	0.87
T2	มันสำปะหลัง	0.69	0.04	0.19	0.91
T3	มันสำปะหลัง	0.87	0.04	0.11	1.02
T4	มันสำปะหลัง	0.55	0.03	0.12	0.71
T5	มันสำปะหลัง	0.52	0.02	0.10	0.64
T6	มันสำปะหลัง	0.95	0.06	0.19	1.19
T7	มันสำปะหลัง	0.60	0.03	0.15	0.78
T8	มันสำปะหลัง	0.26	0.08	0.18	0.52
T9	มันสำปะหลัง	0.49	0.03	0.11	0.62
T10	มันสำปะหลัง	0.57	0.04	0.17	0.77

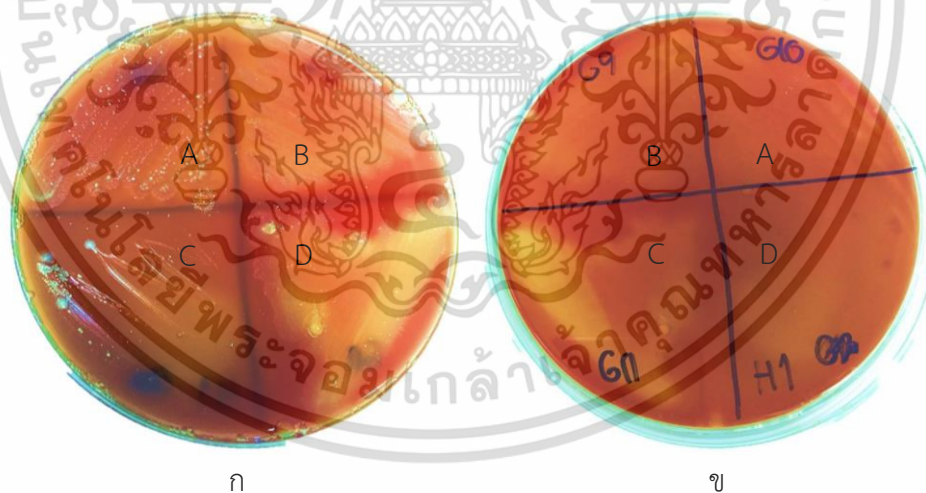
หมายเหตุ: แหล่งที่ 1 คือสระน้ำหลังอาคารเรียนตึกพระเทพฯ; แหล่งที่ 2 คือสระน้ำหน้าคณะเทคโนโลยีการเกษตร; แหล่งที่ 3 คือสระน้ำที่แปลงเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร; แหล่งที่ 4 คือสระน้ำทางเข้าคณะวิศวกรรมศาสตร์; แหล่งที่ 5 คือสระน้ำที่สวนพระนคร; แหล่งที่ 6 คือสระน้ำที่คณะสถาปัตยกรรมศาสตร์; แหล่งที่ 7 คือสระน้ำที่โรงอาหารคณะ อดุสากรรมการเกษตร
ค่าที่รายงานเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 วิเคราะห์การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic Analysis)

เนื่องจากเชื้อ *Clostridium* sp. บางสายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันอันตรายต่อตนเองและเพื่อรักษาความปลอดภัยต่อสถานที่ที่ปฏิบัติงานจึงได้นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบการผลิตอะซิโตนแล้วทั้งหมด 94 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง บนอาหาร blood agar พบว่ามี 18 ไอโซเลต คือไอโซเลต G2, G4, G11, H2, H8, H11, K4, K5, L1, L2, L11, L11, L16, L19, M15, P1, P2 และ P27 (แหล่งที่คัดแยกสามารถดูได้จากข้อมูลในตารางที่ 4.2) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยสังเกตจากการเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบๆ โคลนินบนอาหาร blood agar และทำการฆ่าเชื้อดั่งกล่าวทิ้งทันที ตัวอย่างลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร blood agar แสดงดังรูปที่ 4.2 พื้นที่ตัวอักษร A แสดงให้เห็นว่าโคลนของไอโซเลต G10 มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น ทึบแสง และไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ดังนั้นจึงพิจารณาได้ว่าไอโซเลต G10 ไม่เป็นเชื้อที่ทำให้ก่อโรค (γ -hemolytic) พื้นที่ตัวอักษร B คือไอโซเลต G9 พบว่าโคลนนี้เป็นสีเทา อย่างไรก็ตาม เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างหนาแน่นจึงไม่สามารถสังเกตเป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อได้ และไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ -hemolytic) พื้นที่ตัวอักษร C คือไอโซเลต H1 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่น มีขนาดเล็ก กิ่งโปรงแสง ขอบขรุขระ และไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ -hemolytic) และพื้นที่ตัวอักษร D คือไอโซเลต G11 พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงในบางส่วน กล่าวคือทำให้สีของอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบๆ โคลนิน อาจจำแนกไอโซเลต G11 ได้เป็น β -hemolytic สำหรับไอโซเลต H5 นั้นพบว่าไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (γ -hemolytic) เช่นเดียวกันกับไอโซเลต G10 จากคุณสมบัติของเชื้อ *C. beijerinckii* ที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vos. et al., 2009) ได้อธิบายลักษณะของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Blood agar ดังนี้ โคลนินมีลักษณะเป็นวงกลมขอบขรุขระ โปรงแสง มีสีเทาและเรียบเนียน มีขนาด 1 ถึง 5 มิลลิเมตร และอาจตรวจพบได้ทั้ง α , β หรือ γ -hemolytic



รูปที่ 4.2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินในแหล่งน้ำบนเพลทอาหาร blood agar; (ก) ด้านบนเพลทอาหาร (ข) ด้านหลังเพลทอาหาร

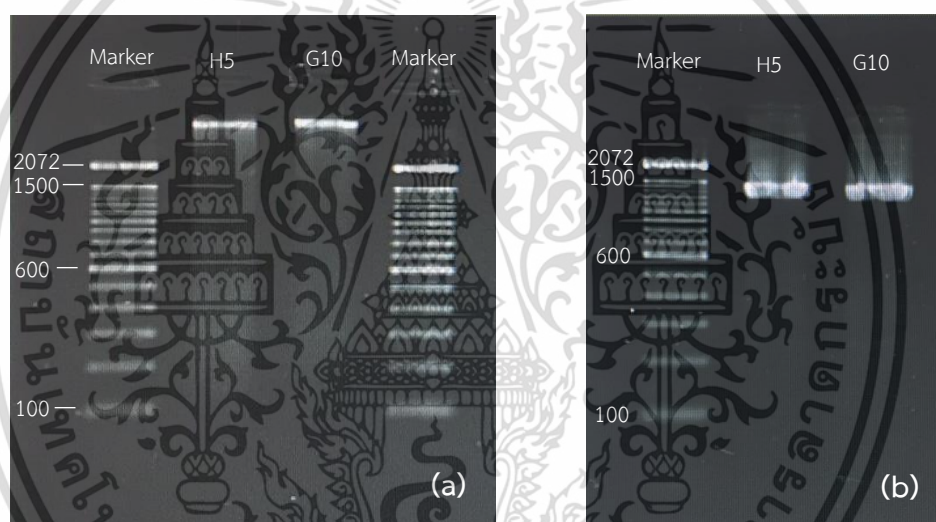
4.3 ระบุสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ด้วยยีน 16S rRNA

เชื้อซึ่งคัดแยกได้ 2 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูง คือไอโซเลต G10 และ H5 ดังข้อมูลในตารางที่ 4.2 ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาจัดจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ยีน 16S rRNA จาก การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) ของไอโซเลต G10 และ H5 พบว่าจีโนมิกที่สกัดได้มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารทรัพย์สินทางปัญญาหรือสิทธิบัตรของกรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้เพื่อการค้าโดยไม่ได้รับอนุญาตจากกรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่า 2,072 คู่เบส เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder) และจีโนมิกที่ได้มีความบริสุทธิ์เนื่องจากไม่มีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและไม่มีโปรตีนปนเปื้อน แสดงดังรูปที่ 4.3 (a) และเมื่อนำจีโนมิกที่ได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทป์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ไอโซเลต G10 และ H5 ที่คัดแยกได้ มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 4.3 (b) ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกันกับฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ได้ระบุขนาดจีโนมิกของเชื้อ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (NC 009617.1) มีขนาด 6,000,632 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA (U16165.1) มีขนาด 1,416 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA ของเชื้อ *C. diolis* DSM 5431 มีขนาด 1,483 คู่เบส จากการศึกษาของ Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้คัดแยกเชื้อ *C. beijerinckii* ASU10 *C. chauvoei* ASU55 และ *C. roseum* ASU58 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA ขนาด 1,192 722 และ 1,198 คู่เบส ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 ความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟริซิส (a) จีโนมิกดีเอ็นเอจากการสกัด; (b) จีโนมิกดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR

4.3.1 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ด้วยวิธีการ Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ทำให้ทราบได้ว่าไอโซเลต G10 และ H5 ที่คัดแยกได้ มีความคล้ายคลึงกับ *C. beijerinckii* และเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการ Blast มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับเชื้อ *Clostridium* sp. สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้ตามข้อมูลที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vos. *et al.*, 2009) โดยการสร้าง Phylogenetic tree แบบ Neighbor-joining (NJ) แสดงดังรูปที่ 4.4 อธิบายได้ว่าค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้เกิดจากการทำซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

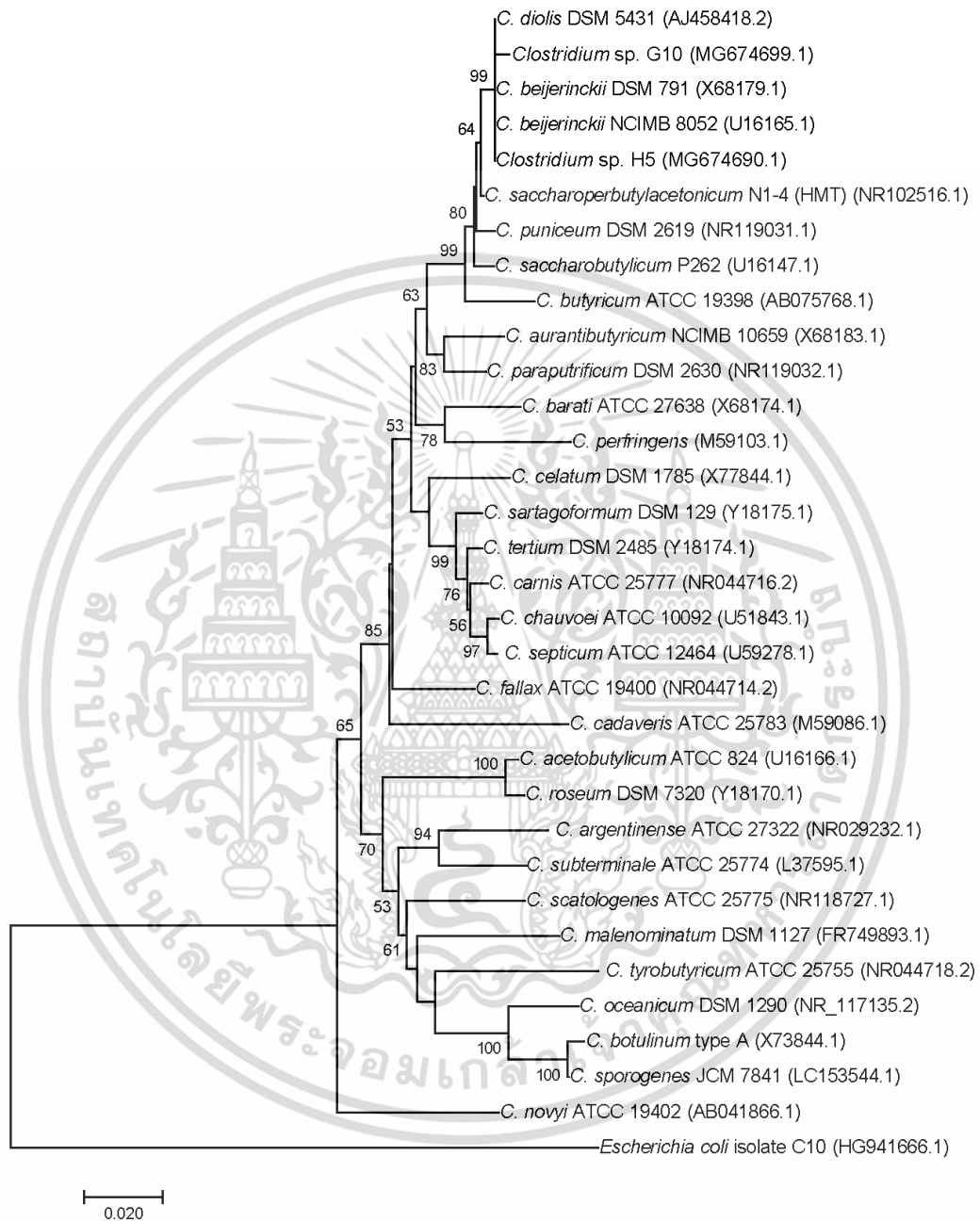
ในเปรียบเทียบ taxa ที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งกำหนดโดยการตั้งค่า bootstrap 1000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) ในขณะที่ความยาวของกิ่งสาขา (branches) ถูกกำหนดให้ความยาวเป็นหน่วยเดียวกันกับระยะทางวิวัฒนาการ ซึ่งถูกคำนวณโดยวิธี Maximum Composite Likelihood (Tamura. *et al.*, 2004) เมื่อพิจารณาไอโซเลต G10 และ H5 พบว่ามีความใกล้เคียงกันกับเชื้อ *C. beijerinckii* NCIMB 8052, *C. beijerinckii* DSM 791 และ *C. diolis* DSM 5431 แต่ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไหนมากกว่า และจากผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีในหัวข้อ 4.4 พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกัน คือมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเหมือนกันกับเชื้อ *C. beijerinckii* และ *C. diolis* จึงไม่สามารถระบุได้

ดังนั้น จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทป์ของไอโซเลต G10 และ H5 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) พบว่าไอโซเลต G10 มีความใกล้เคียงกับ *C. diolis* DSM 5431 99.30 เปอร์เซ็นต์ และ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 99.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต H5 มีความใกล้เคียงกับ *C. diolis* DSM 5431 99.93 เปอร์เซ็นต์ และ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 99.79 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกันกับข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของ *C. beijerinckii* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Vos. *et al.*, 2009) กล่าวคือ *C. beijerinckii* DSM 791 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) มีความใกล้เคียงกันอย่างมากกับ *C. diolis* (99.9 เปอร์เซ็นต์), *C. saccharoperbutylacetonicum* (99.1 เปอร์เซ็นต์), *C. puniceum* (98.6 เปอร์เซ็นต์), *C. saccharobutylicum* (98.6 เปอร์เซ็นต์) และ *C. butyricum* (97.7 เปอร์เซ็นต์) และ Biebl and Spröer (2003) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อ *C. diolis* DSM 15410 มีความใกล้เคียงกันอย่างมากกับเชื้อ *C. beijerinckii* มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์

ในขณะที่รายงานการศึกษาของ Panitz *et al.* (2013) ได้วิเคราะห์ลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ GT6 ที่คัดแยกได้จากตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่ง พบว่าสายพันธุ์ GT6 จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย *C. tetanomorphum* ซึ่งมีความใกล้เคียงกันกับ *C. tetanomorphum* 4474(T) 99 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Chua. *et al.* (2013) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* sp. strain G117 เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ยีน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกันกับ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (99 เปอร์เซ็นต์) และ *C. acetobutylicum* ATCC 824 (88 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อศึกษายีน BDH (butanol dehydrogenase gene) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *bdh* คือ Forward primer (5'-CGA ATT AAT TAA TGG ATT AAA TGA TAA GTT AGA-3') และ R everse primer (5'-TTA CAA ATT AAC TTT AGT TCC ATA GTA TGT-3') พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 BDH 1 (98 เปอร์เซ็นต์) ในปีเดียวกันนี้ Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้วิเคราะห์ลักษณะฟีโนไทป์และยีน 16S rRNA ของเชื้อที่คัดแยกได้ พบว่าเป็น *C. beijerinckii* ASU10, *C. chauvoei* ASU55 และ *C. roseum* ASU58 ซึ่งมีความใกล้เคียงกันกับ *C. beijerinckii* McCoyA 67 (99.5 เปอร์เซ็นต์) *C. chauvoei* strain 2585 (99.3 เปอร์เซ็นต์) และ *C. roseum* strain 653 (99.7 เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ต่อมา Al-Shorgani. *et al.* (2016a) คัดแยกเชื้อที่มีชื่อว่าไอโซเลต YM1 และเมื่อวิเคราะห์ ยีน 16S rRNA พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *C. acetobutylicum* (96 เปอร์เซ็นต์) และเรียกว่าเชื้อที่คัดแยก ได้นี้ว่า *C. acetobutylicum* YM1



รูปที่ 4.4 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Clostridium* sp. H5 *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* spp. วิเคราะห์ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้ โปรแกรม MEGA7 เปรียบเทียบ taxa ที่เกี่ยวข้องกันด้วยค่า bootstrap 1000 ครั้ง และ วิเคราะห์ความยาวของกิ่งสาขา (branches) ด้วยวิธี Maximum Composite Likelihood

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต G10 กับเชื้อ *Clostridium* sp. ในฐานข้อมูลใน EzBioCloud

Rank	Name	Strain	Accession No. ^a	Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
1	<i>C. diolis</i>	DSM 5431	AJ458418	99.30	10/1430	100
2	<i>C. beijerinckii</i>	NCIMB 8052	CP000721 [*]	99.23	11/1432	100
3	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	N1-4(HMT)	CP004121 [*]	98.53	21/1432	100
4	<i>C. chromiireducens</i>	GCAF-1	AY228334	98.53	21/1430	100
5	<i>C. puniceum</i>	DSM 2619	LZZM01000091	98.32	24/1430	100
6	<i>C. saccharobutylicum</i>	DSM 13864	CP006721 [*]	97.90	30/1432	100
7	<i>C. butyricum</i>	DSM 10702	AQQF01000149	97.34	38/1430	100
8	<i>C. paraputrificum</i>	DSM 2630	X73445	96.22	54/1429	99.9
9	<i>C. uliginosum</i>	DSM 12992	AJ276992	96.01	57/1432	100
10	<i>C. sardiniense</i>	DSM 2632	AB161367	95.74	61/1431	100.

หมายเหตุ: ^a คือลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA; * คือลำดับนิวคลีโอไทป์ของทั้งจีโนม

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลต H5 กับเชื้อ *Clostridium* sp. ในฐานข้อมูลใน EzBioCloud

Rank	Name	Strain	Accession No. ^a	Similarity (%)	Diff/Total nt	Completeness (%)
1	<i>C. diolis</i>	DSM 5431	AJ458418	99.93	10/1430	100
2	<i>C. beijerinckii</i>	NCIMB 8052	CP000721*	99.79	11/1432	100
3	<i>C. saccharoperbutylaceticum</i>	N1-4(HMT)	CP004121*	98.88	21/1432	100
4	<i>C. chromiireducens</i>	GCAF-1	AY228334	98.81	21/1430	100
5	<i>C. puniceum</i>	DSM 2619	LZZM01000091	98.81	24/1430	100
6	<i>C. saccharobutylicum</i>	DSM 13864	CP006721*	98.46	30/1432	100
7	<i>C. butyricum</i>	DSM 10702	AQQF01000149	98.11	38/1430	100
8	<i>C. uliginosum</i>	DSM 12992	AJ276992	96.57	54/1429	99.3
9	<i>C. paraputrificum</i>	DSM 2630	X73445	96.36	61/1431	100.
10	<i>C. chartatabidum</i>	DSM 5482	X71850	96.35	52/1428	100

หมายเหตุ: ^a คือลำดับนิวคลีโอไทป์บริเวณ 16S rRNA; * คือลำดับนิวคลีโอไทป์ของทั้งจีโนม

4.4 การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

การทดสอบลักษณะฟีโนไทป์ ได้แก่ การเคลื่อนที่ (Motility) การสร้างเอนไซม์ Catalase ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และอื่นๆ ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 ซึ่งสามารถนำมาพิจารณาความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้น จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้เหมือนกันกับเชื้อ *C. beijerinckii* และเชื้อ *C. diolis* ตามที่ระบุไว้ใน Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Vos. et al., 2009) แต่พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase ไม่สามารถย่อย tryptophan เพื่อสร้างสารอินโดล และ ไม่มีความสามารถในการย่อยเจลาติน เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucopyranoside) ทูรานอส (turanose) เด็กซ์ตริน (dextrin) และ เพคติน (pectin) พบว่าเชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวได้ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Keis. et al. (2001) โดยได้กล่าวไว้ว่าทุกสายพันธุ์ของ *C. beijerinckii* สามารถใช้เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucopyranoside) ทูรานอส (turanose) เด็กซ์ตริน (dextrin) และ เพคติน (pectin) ได้ จากการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ในเตรทพบว่า *Clostridium* sp. G10 มีความสามารถในการรีดิวซ์ในเตรทให้เปลี่ยนเป็นไนโตรที่ ได้ แต่ *Clostridium* sp. H5 ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ในเตรทซึ่งได้ผลเหมือนกันกับการศึกษาของ Vos. et al. (2009) และ Biebl and Spröer (2003) และเมื่อทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อทั้งหมด สามารถใช้ไซโลส (xylose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) มอลโตส (maltose) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucopyranoside) ทรีฮาโลส (trehalose) และเมลิซิโตล (Melezitose) ได้ แต่เชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 ไม่มีความสามารถในการใช้ไรโบส (ribose) กลีเซอรอล (glycerol) อินอซิทอล (inositol) และแรมโนส (rhamnose) ในขณะที่ *C. beijerinckii* ตามการรายงานของ Keis. et al. (2001) สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวได้หรือใช้ได้เล็กน้อย ตามตารางที่ 4.5 และมีเพียง *Clostridium* sp. G10 ที่สามารถใช้แลคโตส (lactose) ได้ ซึ่ง Biebl and Spröer (2003) ได้กล่าวไว้ว่าเชื้อ *C. diolis* และ *C. beijerinckii* มีความใกล้เคียงกันมาก แต่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันคือ *C. diolis* ไม่สามารถใช้ราฟฟิโนส (raffinose) อินอซิทอล (inositol) และแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในขณะที่ *C. beijerinckii* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่ง *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 ไม่สามารถใช้อินอซิทอล (inositol) เหมือนกันกับเชื้อ *C. diolis* แต่สามารถใช้แบ่งได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลต มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไหนมากที่สุด จึงต้องพิจารณาร่วมกันกับการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA

จากการศึกษาของ Abd-Alla. et al. (2015) ได้รายงานลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ *C. beijerinckii* ASU10, *C. chauvoei* ASU55 และ *C. roseum* ASU58 พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสามารถในการใช้ฟรุกโตส ซูโคส และแลคโตส แต่ไม่มีความสามารถในการสร้างสารอินโดล

เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ Catalase และมีเพียง *C. chauvoei* ASU55 ที่สามารถรีดิวซ์ในเตรทได้ แต่ไม่มีความสามารถในการใช้เซลล์ไโปไอสและแป้ง และจากการศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *C. tetanomorphum* GT6 ที่คัดแยกได้ โดย Panitz. et al. (2013) พบว่า *C. tetanomorphum* GT6 มีความสามารถในการใช้กลูโคส ฟรุคโตส มอลโทส ไฮโลส และกลีเซอรอล

ตารางที่ 4.5 ลักษณะฟีโนไทป์ของ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 จากการทดสอบทางชีวเคมี เปรียบเทียบกับลักษณะฟีโนไทป์ของ *C. beijerinckii* และ *C. diolis*

characteristic	G10	H5	<i>C. beijerinckii</i> ¹	<i>C. beijerinckii</i> ²	<i>C. diolis</i> ³
Motility	+	+	NT	+	+
Catalase test	-	-	-	-	-
Indole test	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	-	NT	-	-
gelatin	-	-	-	NT	NT
Carbon source					
arabinose	+	+	+	±	w
xylose	+	+	+	+	+
glucose	+	+	+	NT	+
mannose	+	+	+	+	w
cellobiose	+	+	+	+	+
lactose	-	+	+	+	w
maltose	+	+	+	+	NT
saccharose	+	+	+	NT	NT
methyl-glucopyranoside	+	+	+	NT	NT
dextrin	+	+	+	NT	NT
ribose	-	-	d	-/+	w
glycerol	-	-	w	NT	+
dulcitol	+	+	+	NT	NT
L-arabitol	+	-	+	NT	NT
inositol	-	-	+	NT	NT
mannitol	+	+	+	d	+
sorbitol	+	+	+	-/+	w
Melezitose	+	+	+	+	w
rhamnose	-	-	w	-/+	NT
turanose	+	+	+	NT	NT
inulin	+	+	+	d	NT
pectin	+	+	+	NT	NT
trehalose	+	+	+	±	+
starch	+	+	+	±	-

หมายเหตุ: เครื่องหมาย + คือผลบวก; - คือผลลบ; NB คือไม่แสดงข้อมูล; w คือ weak; d คือให้ผลบวก 40±60%; +/- คือเป็นบวกบางครั้ง; -/+ คือเป็นลบบางครั้ง; ± คือให้ผลบวก 61-89%;

(¹ Keis. et al., 2001; ² Vos. et al., 2009; ³ Biebl and Spröer, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

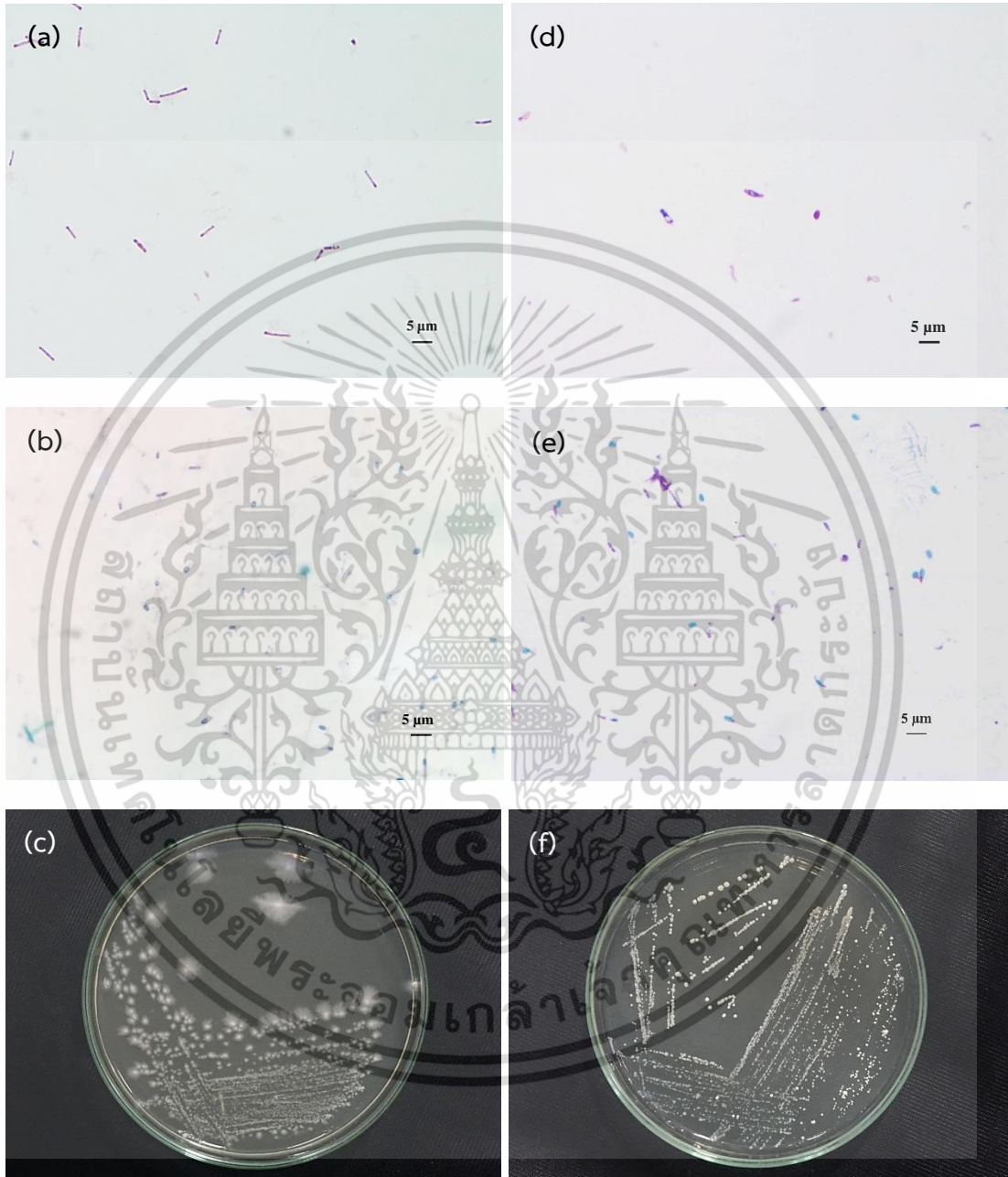
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Clostridium*

เชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงจากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ ดังข้อมูลในตารางที่ 4.2 จึงได้นำมาศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว RCM ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อพิจารณาลักษณะเซลล์จากการย้อมสีแกรม (Gram stain) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า เห็นได้ว่าเซลล์ของ *Clostridium* sp. G10 มีลักษณะเป็นรูปท่อน มีขนาดประมาณ 5 ไมโครเมตร ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ด้านปลายเซลล์และทำให้บริเวณนั้นบวมขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (a) ในขณะที่ลักษณะเซลล์ของ *Clostridium* sp. H5 เป็นรูปท่อนและย้อมติดสีแกรมบวกเช่นเดียวกับ *Clostridium* sp. G10 ดังรูปที่ 4.5 (d) แต่สังเกตได้ว่าขนาดเซลล์ของ *Clostridium* sp. H5 ใหญ่กว่า *Clostridium* sp. G10 เล็กน้อย และการสร้างสปอร์จะค่อนข้างอยู่บริเวณปลายเซลล์ สำหรับการย้อมสีสปอร์ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 (รูปที่ 4.5 (b)) และ *Clostridium* sp. H5 (รูปที่ 4.5 (e)) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า สังเกตลักษณะสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้จากการติดสีเขียวของ malachite green พบว่าสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ และตัวเซลล์ย้อมติดสีแดงของ safranin O ซึ่งผลการศึกษาที่ได้มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *C. beijerinckii* ตามการรายงานใน Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Vos. et al., 2009) ได้ระบุลักษณะเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PYG ไว้ดังนี้ เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งและโค้งมนบริเวณปลายเซลล์ มีขนาด $0.5-1.7 \times 1.7-8.0$ ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ ย้อมติดสีแกรมบวก แต่หากเซลล์มีอายุมาก อาจย้อมติดสีแกรมลบ และสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่อยู่ด้านปลายเซลล์ (subterminal) จากเทคนิคการย้อมสีแกรมและย้อมสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ายังไม่สามารถแยกข้อแตกต่างระหว่างเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 บนเพลทอาหารแข็ง RCM พบว่าเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวขุ่นกึ่งโปร่งแสง แต่บริเวณศูนย์กลางของโคโลนีเป็นสีขาวทึบแสง ผิวเรียบเนียน โคโลนีมีขนาดใหญ่ประมาณ 1 ถึง 10 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม และขอบมีลักษณะขรุขระ ดังรูปที่ 4.5 (c) ในขณะที่ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* sp. H5 เป็นสีขาว ทึบแสง ผิวเรียบเนียนและมันวาว รูปร่างกลม ขอบขรุขระ และโคโลนีมีขนาดเล็กประมาณ 1.5 มิลลิเมตรหรือน้อยกว่า ดังรูปที่ 4.5 (f) จากลักษณะโคโลนีดังกล่าวสามารถบ่งบอกได้ถึงความแตกต่างของ *Clostridium* sp. G10 และ *Clostridium* sp. H5 ได้อย่างชัดเจน

4.6 สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก

จากกระบวนการคัดแยกเชื้อในขั้นต้น ไอโซเลต G10 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 5.89 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว T6 ปริมาตร 5 มิลลิตร เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

ออกซิเจน ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลต G10 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำลายให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยทำการหมักในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ค่า pH เริ่มต้นของอาหารต่างกัน และหมักในอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

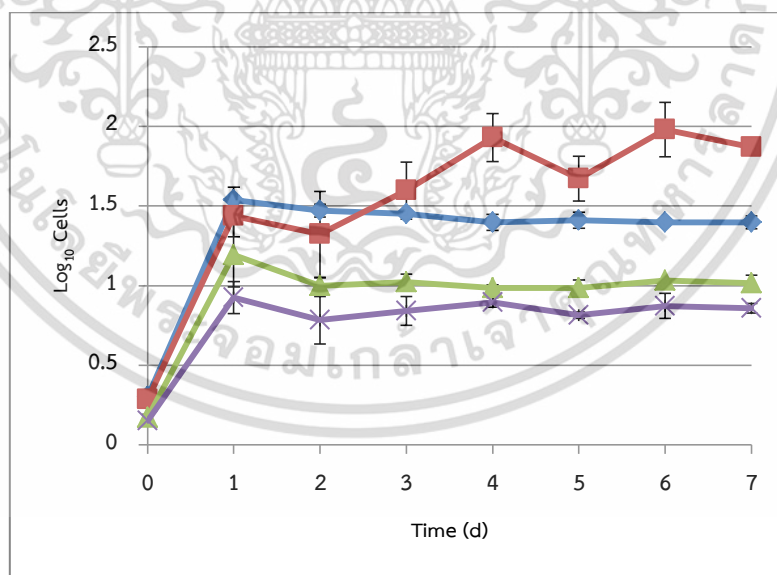


รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 (ซ้าย) และ: *Clostridium* spp. H5 (ขวา): (a) และ (d) การย้อมแกรม (กำลังขยาย 1000 เท่า); (b) และ (e) การย้อมสปอร์ (กำลังขยาย 1000 เท่า); (c) และ (f) ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง RCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

การทดสอบความสามารถในการผลิต ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหารที่แตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ RCM, T6, GYCC และ P2 ที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเซลล์พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) ในวันแรกและการเจริญเติบโตคงที่จนถึงวันที่ 7 ของการหมัก แสดงดังรูปที่ 4.6 ซึ่งเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหาร RCM และ T6 ได้ดีกว่าในอาหาร GYCC และ P2 เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน กล่าวคืออาหาร RCM มีองค์ประกอบของสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) และเปป्टอน (Peptone) ในปริมาณที่มากกว่าอาหารอีก 3 ชนิด ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และวิตามินที่ช่วยส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเชื้อ สำหรับอาหาร T6 มีองค์ประกอบของทริปโตเนน (Tryptone) และสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) รองจากอาหาร RCM และมีแหล่งไอออนของโลหะ เช่น Fe^{2+} ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จากผลการเจริญเติบโตของเซลล์พบว่ามีความสอดคล้องกันกับการใช้กลูโคสในอาหารทั้ง 4 ชนิด กล่าวคือความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการหมักในอาหาร RCM, GYCC และ P2 ยกเว้น T6 ที่ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก เนื่องจากในช่วงแรกเชื้อต้องการใช้กลูโคสเป็นจำนวนมากเพื่อใช้สร้างพลังงานในการเจริญเติบโต เมื่อผ่านช่วงการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) เชื้อจะใช้กลูโคสเพื่อเจริญเติบโตควบคู่กับการผลิตตัวทำละลาย ในขณะที่เชื้อมีการใช้กลูโคส

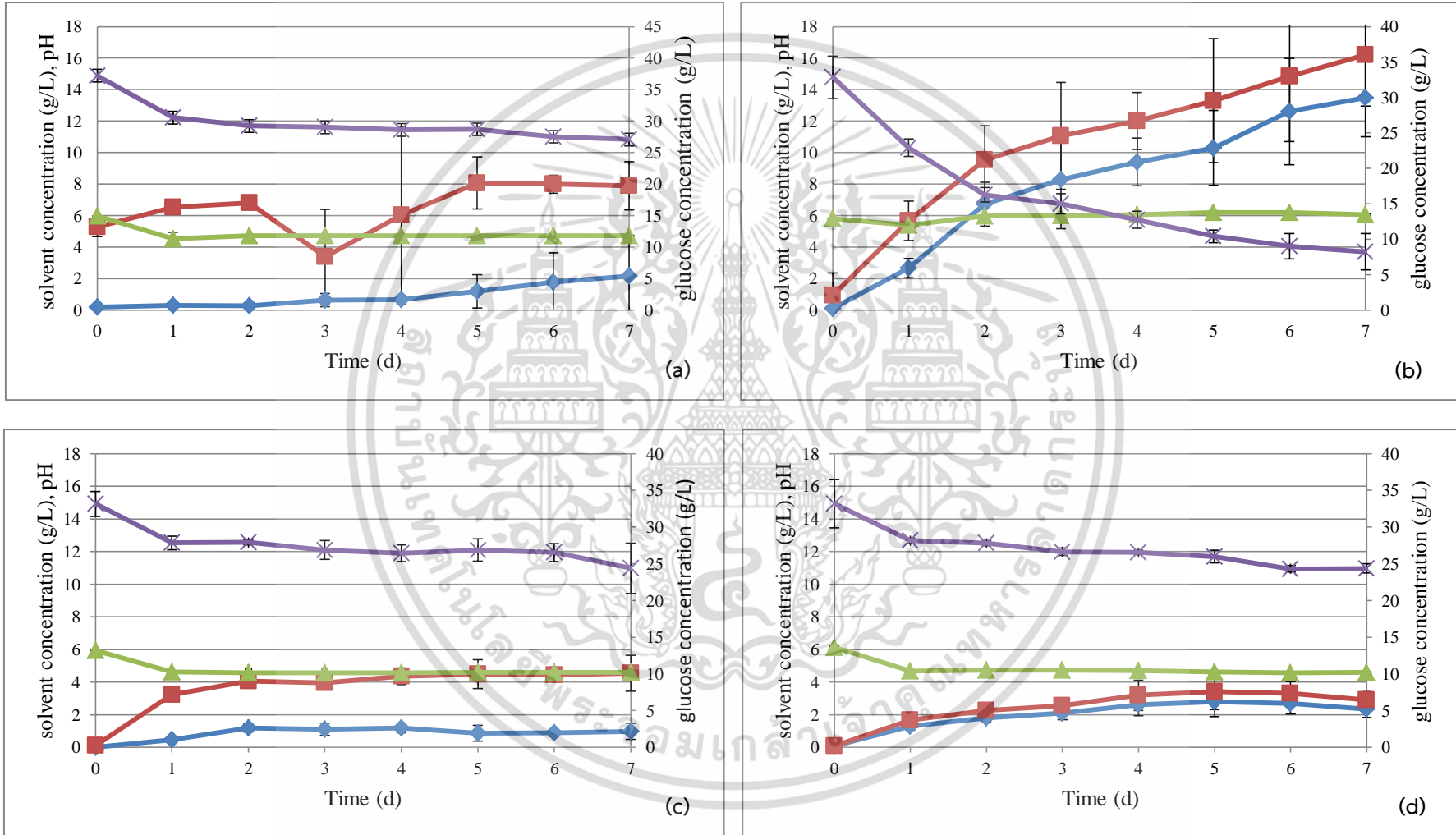


รูปที่ 4.6 อัตราการเจริญเติบโต (OD_{600}) ของ *Clostridium* sp. G10 ในกระบวนการหมักของอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; ◆ RCM; ■ T6; ▲ GYCC และ × P2

ในการกระบวนการหมักระยะแรกเชื้อจะสร้างกรดอินทรีย์ออกมา ได้แก่ กรดบิวทิริก และกรดอะซิติก (Jones and Woods, 1986) จึงส่งผลให้ค่า pH ในน้ำหมักของอาหารทั้ง 4 ชนิด ลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 1 ของการหมัก คือมีค่า pH ประมาณ 4.6, 5.4, 4.6 และ 4.7 ในน้ำหมักของอาหาร RCM, T6, GYCC และ P2 ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยเชื้อจะนำกรดอินทรีย์ส่วนหนึ่งที่สร้างออกมาในระยะแรกมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวทำละลาย จึงส่งผลให้ค่า pH ในน้ำหมักของอาหาร T6 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และค่า pH คงที่ในน้ำหมักของอาหารอีก 3 ชนิด ตลอดจนระยะเวลาของการหมักครบ 7 วัน ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับความเข้มข้นของกลูโคสที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการหมักในอาหาร RCM, GYCC และ P2 ยกเว้น T6 ที่ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก และหลังจากการหมักครบ 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหาร RCM, GYCC, P2 และ T6 คือ 27.09, 24.38, 24.36 และ 8.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลทั้งหมดที่กล่าวมานี้แสดงดังรูปที่ 4.7

ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ได้จากการหมัก พบว่าการหมักในอาหาร T6 (รูปที่ 4.7b) ให้ผลผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด คือ 13.49 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 16.21 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.63 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.09 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ผลิตได้ในวันอื่นๆ (ข้อมูลการเปรียบเทียบแสดงในภาคผนวก จ) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ได้จากการหมักในอาหาร RCM (รูปที่ 4.7a) พบว่าในการหมักเชื้อสามารถผลิตบิวทานอลได้น้อยกว่าอาหาร T6 แต่มีความสามารถในการผลิตอะซิโตนได้สูง และไม่พบการผลิตเอทานอลเลย ซึ่งความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้มากที่สุดคือ 2.17 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 7.89 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการผลิตตัวทำละลายในวันอื่นๆ (ภาคผนวก ค) สำหรับการหมักในอาหาร GYCC (รูปที่ 4.7c) เชื้อมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลได้เพียง 1.17 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 4.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ของการหมัก และผลิตเอทานอลได้น้อยมากหรือไม่ผลิตเลย ในขณะที่การหมักในอาหาร P2 (รูปที่ 4.7d) สามารถผลิตบิวทานอลได้ 2.60 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 3.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก และพบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้น้อยมากหรือไม่ผลิตเลย

จากตารางที่ 4.6 เมื่อทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดในแต่ละอาหาร เห็นได้ว่าการหมักในอาหาร T6 ให้ผลได้บิวทานอลสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รองลงมาคือ P2, RCM และ GYCC ตามลำดับ ส่วนค่าผลได้และค่าประสิทธิภาพในการหมักก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือการหมักในอาหาร T6 ให้ค่าผลได้และค่าประสิทธิภาพในการหมักของบิวทานอลสูงที่สุด 0.55 กรัมต่อกรัม และ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับการหมักในอาหารอีก 3 ชนิด จึงได้คัดเลือกอาหาร T6 เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 4.7 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; (a) RCM; (b) T6; (c)

GYCC; (d) P2; ◆ Butanol; ■ ABE; ▲ pH; ✕ Glucose

จากการศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอลในอาหาร 4 ชนิด คือ RCM, AnS, P2 และ TYA (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 ที่คัดแยกได้ พบว่าในอาหาร RCM เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดซึ่งให้ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ในขณะที่อาหาร TYA เป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับผลิตบิวทานอลสามารถผลิตได้มากที่สุดคือ 6.20 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 8.93 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหาร P2 ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้ 5.69 กรัมต่อลิตร (Al-Shorgani. *et al.*, 2016a) และการศึกษาของ Formanek. *et al.* (1997) ได้ทำการหมักในอาหาร P2 โดยเชื้อ *C. beijerinckii* 8052 (wild-type strain) และ *C. beijerinckii* BA101 (mutant) สามารถผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายได้ 9.2 และ 18.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

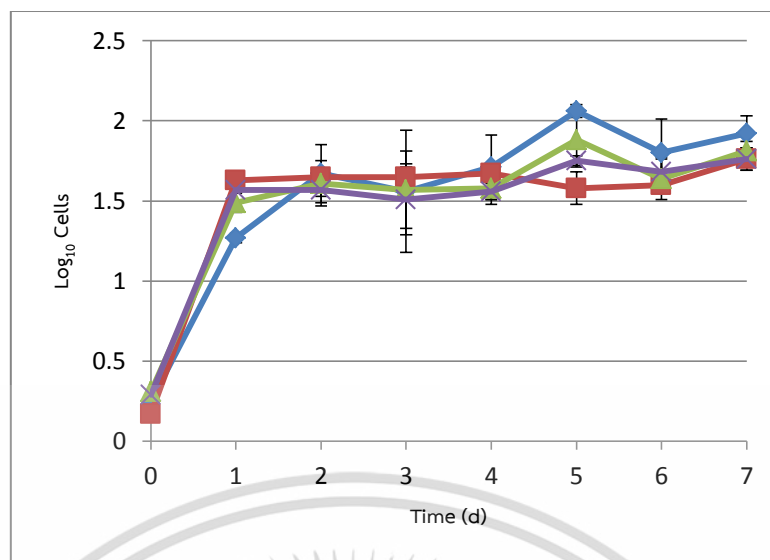
ตารางที่ 4.6 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร 4 ชนิด คือ RCM T6 GYCC และ P2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

อาหาร	เวลา (วัน)	บิวทานอล			ตัวทำละลายทั้งหมด		
		ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)	ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)
RCM	7	2.17±2.50 ^b	0.16±0.20 ^c	0.01±0.01 ^b	7.89±1.52 ^b	0.23±0.09 ^c	0.02±0.00 ^b
T6	7	13.49±2.49 ^a	0.55±0.05 ^a	0.08±0.01 ^a	16.21±3.25 ^a	0.63±0.10 ^a	0.09±0.01 ^a
GYCC	2	1.20±0.25 ^b	0.26±0.13 ^{ab}	0.03±0.00 ^b	4.06±0.10 ^c	0.80±0.25 ^a	0.04±0.00 ^a
P2	4	2.6±0.67 ^b	0.44±0.19 ^{ab}	0.02±0.00 ^b	3.20±0.93 ^c	0.54±0.24 ^{ab}	0.03±0.00 ^b

หมายเหตุ: a, b, c ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความสามารถในการผลิตบิวทานอล และ ABE ค่าผลได้ และประสิทธิภาพในการหมัก ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.6.2 ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

การศึกษาค่า pH เริ่มต้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมด โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาหาร T6 เป็นอาหารที่ได้รับการคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ (หัวข้อ 4.6.1) และได้ทำการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นแตกต่างกันคือ 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ผลที่ได้จากการบวกรวมหมักพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีอัตราการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) ในวันแรกของการหมักและการเจริญเติบโตคงที่จนถึงวันที่ 7 ซึ่งให้ผลเหมือนกันทั้ง 4 ปัจจัยในการทดลอง ดังรูปที่ 4.8 เมื่อพิจารณาค่า pH ในน้ำหมักพบว่า pH เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่า 6.5 7.0 7.1 และ 6.9 ในวันที่ 2 ของการหมักในอาหารที่ค่า pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ และหลังจากนั้น pH จะค่อยๆ ลดลง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (7 วัน) พบว่า pH มีค่าประมาณ 4.8 ถึง 4.9 แสดงดังรูปที่ 4.9 เนื่องจากในการเจริญเติบโตเชื้อต้องใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นเพื่อสร้างพลังงานในการทำกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ จึงทำให้กลูโคสมีความเข้มข้นลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก ซึ่งให้ผลเหมือนกันกับการทดลองการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมก่อนหน้านี้ โดยเหลือเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 อัตราการเจริญเติบโต (OD_{600}) ของ *Clostridium* sp. G10 ในกระบวนการหมัก ABE ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; ◆ pH 5.0; ■ pH 5.5; ▲ pH 6.0; × pH 6.5

กลูโคสความเข้มข้น 14.04, 14.04, 11.63 และ 14.70 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ หลังจากนั้นความเข้มข้นของกลูโคสค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก และมีความเข้มข้นกลูโคสเหลือในอาหารเพียง 11.17, 11.87, 8.36 และ 12.56 กรัมต่อลิตร ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการผลิตตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้น โดยที่ pH เริ่มต้น 5.0 เชื่อสามารถผลิตตัวทำละลายได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการหมัก คือ สามารถผลิตบิวทานอลได้ 7.66 กรัมต่อลิตร และการผลิตมีแวนอีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันที่ 7 ของการหมัก ทำให้ผลิตบิวทานอลสุดท้ายที่ได้มากที่สุดคือ 11.52 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.19 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.47 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.20 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับตัวทำละลายที่ผลิตได้ในวันอื่นๆ ($p < 0.05$) (ข้อมูลการเปรียบเทียบแสดงในภาคผนวก จ) เมื่อพิจารณาผลการผลิตตัวทำละลายของเชื้อในอาหารที่ pH เริ่มต้น 5.5 พบว่าแวนอีนในการผลิตตัวทำละลายคล้ายคลึงกันกับการหมักที่ pH เริ่มต้น 5.0 และผลผลิตที่ได้มีค่าใกล้เคียงกันมาก ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 11.89 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.02 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.00 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.1 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับตัวทำละลายที่ผลิตได้ในวันอื่นๆ (ภาคผนวก จ) โดยที่ในการหมักที่ pH เริ่มต้น 6.0 สามารถผลิตตัวทำละลายได้มากกว่า pH เริ่มต้น 5.0 และ pH เริ่มต้น 5.5 เล็กน้อย คือสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด 12.04 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.83 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.51 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.28 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับตัวทำละลายที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

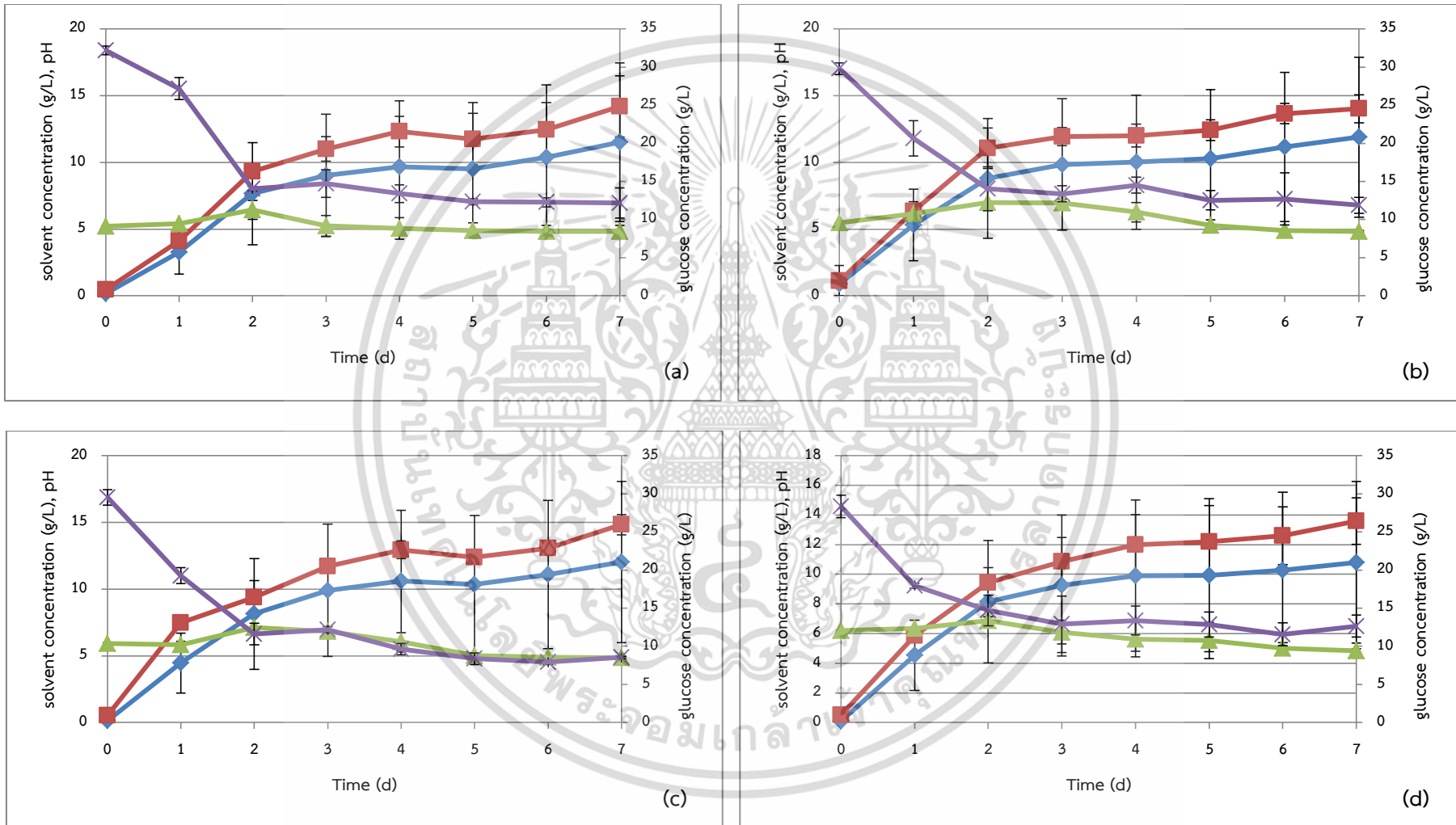
ผลิตได้ในวันอื่นๆ (ภาคผนวก ค) ในขณะที่ การหมักที่ pH เริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตตัวทำละลายน้อยที่สุดในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งผลิตบิวทานอลได้ความเข้มข้น 10.81 กรัมต่อลิตรและตัวทำละลายทั้งหมด 13.57 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.54 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.23 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก และมีความแตกต่างกันกับตัวทำละลายที่ผลิตได้ในวันอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ) จากตารางที่ 4.7 เมื่อนำผลผลิตของบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดที่ได้มากที่สุดในแต่ละปัจจัยมาเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนค่าผลได้ของบิวทานอลมีค่าสูงที่สุดเมื่อหมักที่ pH เริ่มต้น 6.5 คือ 0.65 กรัมต่อกรัม และค่าประสิทธิภาพในการหมักของบิวทานอลที่ pH เริ่มต้น 6.5 คือ 0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นในการศึกษาหาสภาวะความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมจึงได้เลือกที่จะไม่ปรับค่า pH เริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.7 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร T6 ที่ค่า pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

pH	เวลา (ชม.)	บิวทานอล			ตัวทำละลายทั้งหมด		
		ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)	ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)
5.0	168	11.52±1.77 ^a	0.57±0.05 ^a	0.07±0.01 ^a	14.19±2.29 ^a	0.69±0.07 ^b	0.08±0.01 ^a
5.5	168	11.23±1.31 ^a	0.58±0.09 ^a	0.06±0.00 ^a	14.02±1.06 ^a	0.72±0.04 ^{ab}	0.08±0.00 ^a
6.0	168	12.04±0.66 ^a	0.57±0.06 ^a	0.07±0.00 ^a	14.83±0.76 ^a	0.68±0.06 ^b	0.09±0.00 ^a
6.5	168	10.81±0.93 ^a	0.68±0.05 ^a	0.06±0.01 ^a	13.57±1.56 ^a	0.83±0.08 ^a	0.08±0.01 ^a

หมายเหตุ: a, b, c ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความสามารถในการผลิตบิวทานอลและ ABE ค่าผลได้ และประสิทธิภาพในการหมัก ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

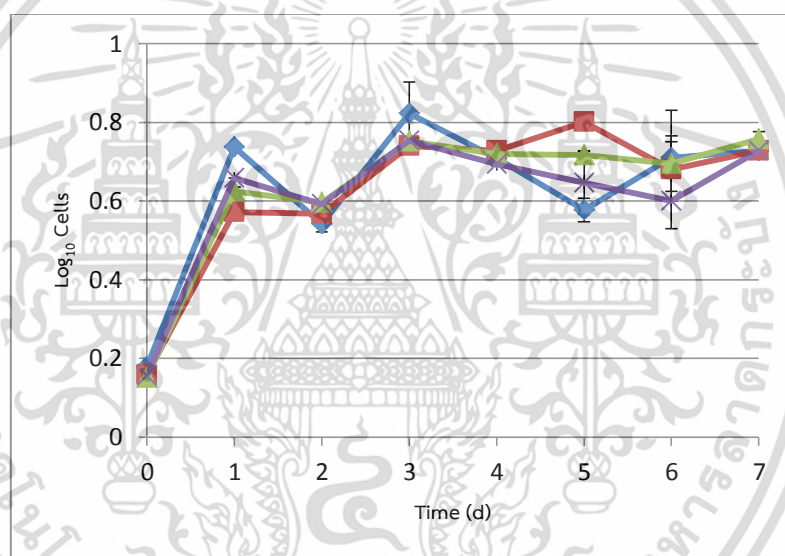
จากรายงานของ Chua. *et al.* (2013) ได้ศึกษาการหมักโดยเชื้อ *Clostridium* sp. G117 ในอาหารที่ความเข้มข้นกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร และมีค่า pH เริ่มต้น 5.0, 6.0 และ 6.5 พบว่าเมื่อปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 6.0 (น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร) สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 6.45 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหมักในสภาวะเดิม (pH เริ่มต้น 6.0 และกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) แต่มีสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 0.4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถผลิตบิวทานอลได้มากถึง 13.50 กรัมต่อลิตร ต่อมา Li. *et al.* (2016) ได้ศึกษาการหมักโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* SE25 ที่ค่า pH แตกต่างกันคือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 พบว่าที่ pH 5.0 ให้ผลผลิตบิวทานอลสูงที่สุด คือ 8.49 และ ABE 12.49 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ pH 5.5 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 7.50 และ ABE 10.83 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.9 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; (a) pH 5.0; (b) pH 5.5; (c) pH 6.0; (d) pH 6.5; ◆ Butanol; ■ ABE; ▲ pH; ✕ Glucose

4.6.3 ความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

สูตรอาหาร T6 ที่ได้รับคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้านี้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมัก ABE ที่ความเข้มข้นของกลูโคสแตกต่างกันคือ 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อลิตร และค่า pH เริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.6 ถึง 5.9 เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ ผลจากการศึกษาพบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีอัตราการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (log phase) ในวันแรก และการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยในวันที่ 2 ของการหมัก จากนั้นเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 และคงที่จนถึงวันที่ 7 ของการหมัก ในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 30 และ 60 กรัมต่อลิตร มีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 5 และวันที่ 6 ของการหมัก ตามลำดับ และจากค่าความขุ่นที่วัดได้ พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าการทดลองก่อนหน้านี้ทั้ง 2 การทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 อัตราการเจริญเติบโต (OD₆₀₀) ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ในกระบวนการหมัก ABE ที่น้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; ◆ 30 กรัมต่อลิตร; ■ 40 กรัมต่อลิตร; ▲ 50 กรัมต่อลิตร; × 60 กรัมต่อลิตร

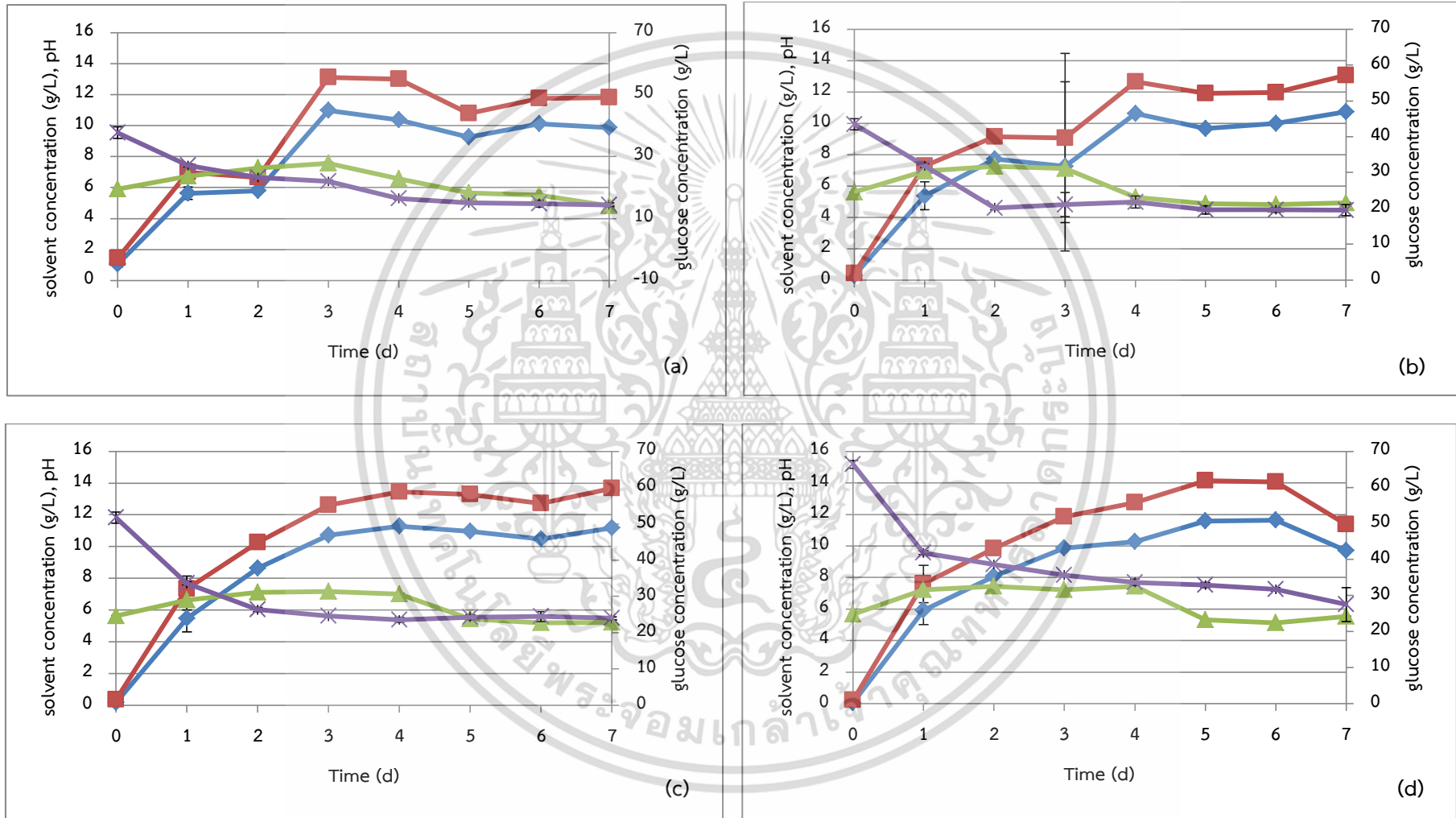
จากรูปที่ 4.11 เมื่อพิจารณากิจกรรมการหมักในอาหารที่กลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11a) พบว่าเชื้อใช้อัตราการใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ทำให้ในวันแรกสามารถผลิตบิวทานอลได้ 5.63 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 7.00 กรัมต่อลิตร ส่วนในวันที่ 2 ของการหมัก พบว่าการผลิตตัวทำละลายของเชื้อเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นคือ 5.78 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.64 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงขึ้นและผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก คือ 10.97 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.10 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.03 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีความแตกต่างเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ) และมีความเข้มข้นกลูโคส 21.98 กรัมต่อลิตร แต่วันที่ 4 จนถึง 7 ของการหมักตัวทำละลายที่ผลิตได้มีความเข้มข้นลดลงเล็กน้อย และมีกลูโคสเหลือเพียง 14.42 กรัมต่อลิตร สาเหตุที่ทำให้เชื้อผลิตตัวทำละลายได้สูงที่สุดในวันที่ 3 ของการหมัก อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกของการหมัก pH มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 3 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในระหว่างการหมักเชื้อมีการผลิตกรดอินทรีย์ได้น้อยจึงทำให้สารตั้งต้นในการผลิตตัวทำละลายลดลงไปด้วย และหลังจากนั้นเชื้อมุ่งเข้าสู่ระยะการผลิตกรดอินทรีย์จึงทำให้ pH มีค่าลดลง และไม่เกิดการผลิตตัวทำละลายจนสิ้นสุดการหมัก (Jones and Woods, 1986) สำหรับการหมักในอาหารที่กลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11b) เห็นได้ว่าเชื้อมีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก ทำให้ความเข้มข้นกลูโคสเหลือเพียง 21.73 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อมีการใช้กลูโคสน้อยมากจนสิ้นสุดกระบวนการหมักมีความเข้มข้นกลูโคส 19.52 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด 10.74 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.05 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.15 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.17 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับความเข้มข้นบิวทานอลในการหมักวันที่ 4 คือ 12.64 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.05 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.91 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก จ) ส่วนค่า pH ในน้ำหมักนั้นให้ผลเช่นเดียวกันกับการหมักที่กลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การหมักที่กลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11c) มีการใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันกับการหมักที่กลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร คือกลูโคสมีความเข้มข้นลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการหมัก และมีความเข้มข้นอยู่ที่ 26.34 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อมีการใช้กลูโคสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเชื่อมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลมากที่สุด 11.29 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.45 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.04 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.12 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ) ส่วนค่า pH ในน้ำหมักนั้นให้ผลเช่นเดียวกันกับการหมักที่กลูโคสเริ่มต้น 30, 40 และ 60 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุดที่กลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.11d) คือสามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.64 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.05 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.31 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.11 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 6 ของการหมัก แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ) กับวันที่ 5 ของการหมัก คือ สามารถผลิตบิวทานอลได้ 11.58 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.13 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.42 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.13 กรัมต่อลิตร) และเหลือความเข้มข้นกลูโคสเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก 32.90 กรัมต่อลิตร จากข้อมูลในตารางที่ 4.8 เมื่อนำความเข้มข้นของบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดที่เชื้อสามารถผลิตได้มากที่สุดในแต่ละปัจจัยมาเปรียบเทียบกัน พบว่าในการหมักโดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุดดังกล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จึงได้คัดเลือกความเข้มข้นของกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ไปใช้ในการศึกษาการใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการ

ย่อยด้วยเอนไซม์มาเป็นวัตถุดิบในการหมักด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 กระบวนการหมัก ABE ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่น้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; (a) 30 กรัมต่อลิตร; (b) 40 กรัมต่อลิตร; (c) 50 กรัมต่อลิตร; (d) 60 กรัมต่อลิตร; ◆ Butanol; ■ ABE; ▲ pH; ✕ Glucose

จากการศึกษาของ Kheyrandish. *et al.* (2015) ได้ทำการหมักเพื่อผลิต ABE ในอาหาร PGY+P2 โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NRRL B-591 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าในการหมัก 48 ชั่วโมง สามารถผลิตบิวทานอลได้ 5.2, 9.3, 11.0 และ 11.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้น Al-Shorgani. *et al.* (2016a) ได้ศึกษาความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นตั้งแต่ 20 กรัมต่อลิตร จนถึง 100 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมัก ABE ด้วยเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 ในอาหาร TYA พบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 20 ถึง 50 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งมีความเข้มข้นมากที่สุดคือ 9.48 และ 12.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และปริมาณผลผลิต

ตารางที่ 4.8 การผลิตบิวทานอลและ ABE โดย *Clostridium* sp. G10 ในอาหาร T6 ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

น้ำตาล (g/L)	เวลา (ชม.)	บิวทานอล			ตัวทำละลายทั้งหมด		
		ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)	ความเข้มข้น (g/L)	ผลได้ (g/g)	ประสิทธิภาพในการหมัก (g/L h)
30	72	10.97±0.04 ^c	0.64±0.07 ^a	0.14±0.01 ^a	13.10±0.04 ^c	0.75±0.09 ^a	0.16±0.00 ^a
40	96	10.63±0.05 ^d	0.48±0.07 ^b	0.11±0.00 ^c	12.64±0.06 ^d	0.57±0.08 ^b	0.13±0.00 ^d
50	96	11.29±0.04 ^b	0.40±0.02 ^{bc}	0.12±0.00 ^b	13.45±0.07 ^b	0.46±0.02 ^{bc}	0.14±0.00 ^b
60	120	11.58±0.06 ^a	0.35±0.02 ^c	0.10±0.00 ^d	14.13±0.13 ^a	0.42±0.03 ^c	0.12±0.00 ^c

หมายเหตุ: a, b, c ตัวอักษรที่ต่างกันในระดับเดียวกันแสดงถึงความสามารถในการผลิตบิวทานอลและ ABE ค่าผลได้ และประสิทธิภาพในการหมัก ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดลดลงเรื่อยๆ เมื่อมีความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้คล้ายคลึงกับการทดลองของ Li. *et al.* (2013) ซึ่งได้ทำการหมักโดยเชื้อ *C. beijerinckii* MUT3 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40, 50, 60, 70 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด 14.0 กรัมต่อลิตร จากกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร ผลผลิตบิวทานอลที่ได้มีปริมาณลดลงอาจเนื่องจากการยับยั้งของสารตั้งต้น ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับการรายงานของ Al-Shorgani. *et al.* (2011) พบว่าการหมักที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* N 1-4 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 8.69 กรัมต่อลิตร และ ABE 13.61 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 4.81 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.11 กรัมต่อลิตร) และผลผลิตบิวทานอลที่ได้มีปริมาณลดลงที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร

4.7 การใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก

4.7.1 การย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์

จากการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และ ACCELLERASE-1500 พบว่าสามารถย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 64.23 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการศึกษาการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์ของสิริมาและคณะ (2558) แสดงให้เห็นว่าการย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ACCELLERASE1500) เพียงอย่างเดียวสามารถย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 5.23 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เอนไซม์อะไมเลส (α -amylase ร่วมกับ glucoamylase) สามารถย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 8.54 กรัมต่อลิตร และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และ ACCELLERASE-1500 พบว่าเอนไซม์ผสมมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีที่สุด สามารถย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 31.79 กรัมต่อลิตร แต่มีค่าน้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้เกือบสองเท่า อาจเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ได้นำวัตถุดิบไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อความดันไอน้ำ (autoclave) ทำให้เกิดการปรับสภาพของเส้นใยเปลือกเผือกบางส่วนได้ ในขณะที่ การรายงานของณัฐพงษ์และเศรษฐวัชร (2558) ได้ศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกันคือเอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อยกากมันสำปะหลังสามารถย่อยได้น้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งได้ผลคล้ายคลึงกันกับการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสหรือกลูโคอะไมเลสเพียงชนิดเดียวในการย่อย และเมื่อใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คือแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลส พบว่าสามารถย่อยได้น้ำตาลกลูโคสปริมาณสูงคือ 82.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ย่อยเม็ดแป้งที่เกาะอยู่บริเวณนอกเส้นใยของกากมันสำปะหลังให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่ง และการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสได้ย่อยเส้นใยเซลลูโลสทำให้เม็ดแป้งที่อยู่ด้านในเส้นใยหลุดออก ส่งผลให้แป้งถูกเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ย่อยกลายเป็นน้ำตาลได้อีก

4.7.2 กระบวนการหมักเพื่อผลิต ABE

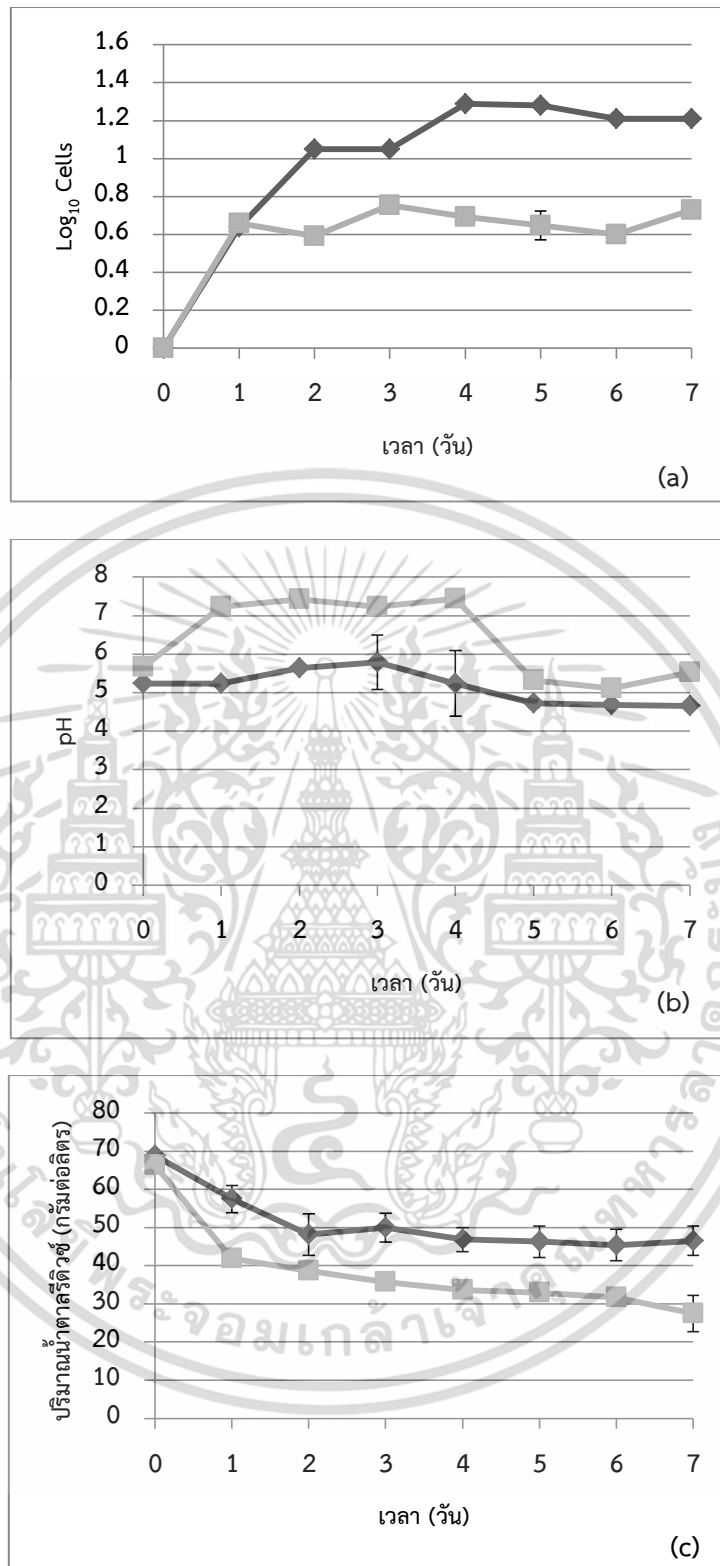
จากกระบวนการหมักตัวทำละลายด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยเปลือกเผือกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลในสูตรอาหาร T6 ที่ได้รับคัดเลือกในการศึกษาขั้นต้น เปรียบเทียบกับการหมักในอาหาร T6 โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12a ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารที่ใช้สารละลายเปลือกเผือกในการหมักได้ดีกว่า เนื่องจากในเปลือกเผือกนั้นยังมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์อื่น เช่น ไขมัน โปรตีน และวิตามิน (สิริมาและคณะ, 2558) อีกทั้งยังมีองค์ประกอบของแร่ธาตุและสารประกอบบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต (trace element) เช่น Fe, Mg, Zn, Mn, Co, NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , Cl^- เป็นต้น (Kobayashi. *et al.*, 2011) ซึ่งฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์เพื่อรักษาค่า pH ของอาหารให้อยู่ภายในขอบเขตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และไนโตรเจนมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Atlas, 2010) เมื่อพิจารณาค่า pH พบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในการหมักทั้งสองปัจจัยมีความคล้ายกัน คือเพิ่มขึ้นในระยะแรกและลดลงในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักด้วยสารละลายเปลือกเปลือกและการหมักด้วยกลูโคส ตามลำดับ (รูปที่ 4.12b)

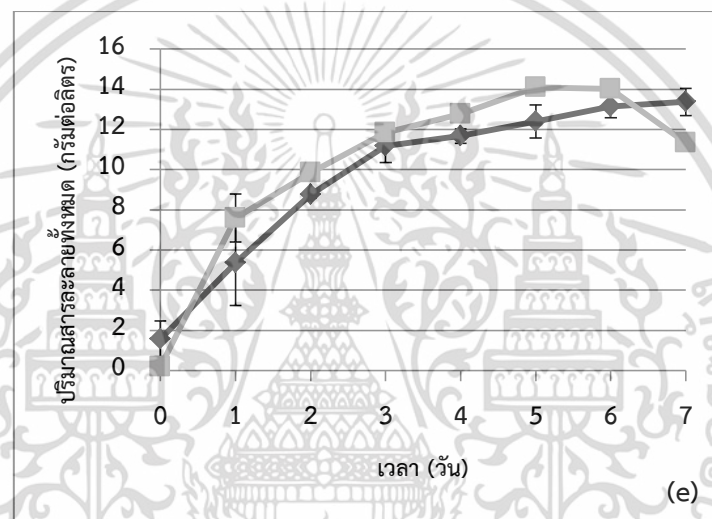
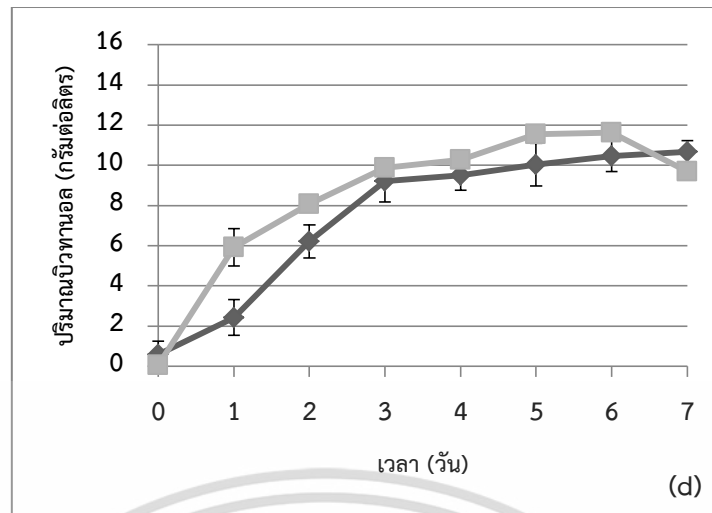
จากรูปที่ 4.12d แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีอัตราการผลิตตัวทำละลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้ 9.21 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 11.18 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.08 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.89 กรัมต่อลิตร) ในการหมักด้วยสารละลายเปลือกเปลือก ในขณะที่การหมักด้วยกลูโคสสามารถผลิตบิวทานอลได้ 10.97 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.10 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.03 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นความเข้มข้นของตัวทำละลายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าผลผลิตบิวทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้กลูโคสในอาหาร T6 ได้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 11.64 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 14.05 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.31 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.11 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 6 ของการหมัก และการหมักโดยใช้สารละลายเปลือกเปลือกสามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุดคือ 10.67 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.37 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 1.80 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.90 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 7 ของการหมัก (รูปที่ 4.12d และ 4.12e) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาคผนวก จ)

เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือมาพิจารณาพร้อมด้วยเห็นได้ว่าการหมักด้วยกลูโคสมีน้ำตาลที่เหลืออยู่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักคือ 27.5 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักโดยใช้เปลือกเปลือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์พบว่ามีย่าน้ำตาลที่เหลือ 46.53 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12c) ซึ่งเหลือปริมาณมากกว่าเกือบสองเท่าของการหมักโดยใช้กลูโคสในอาหาร T6 ในขณะที่ผลผลิตที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.9 และเมื่อนำมาคำนวณค่าผลได้ (yield) ของบิวทานอลและตัวละลายทั้งหมด ที่ได้จากการหมักด้วยสารละลายเปลือกเปลือก คือ 0.46 และ 0.54 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการหมัก และมีผลได้มากกว่าการหมักด้วยกลูโคส จากการศึกษาของ Abd-Alla. *et al.* (2015) ได้เปรียบเทียบการหมัก ABE โดยเชื้อ *C. beijerinckii* ASU10 จากการใช้อินทผลัมมาเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถผลิตบิวทานอลได้มากถึง 16.16 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 24.07 กรัมต่อลิตร และจากการรายงานของ Thang. *et al.* (2010) สามารถผลิตบิวทานอลได้ 16.2 กรัมต่อลิตร โดยการใช้แป้งข้าวโพดในการหมักโดยเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 และ Al-Shorgani. *et al.* (2016a) ได้รายงานการผลิต ABE โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* YM1 จากการใช้กากรำสกัดน้ำมัน (deoiled rice bran) เป็นสารตั้งต้นซึ่งมีน้ำตาลรีดิวซ์ 10.57 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดได้ 3.49 และ 5.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.12 กระบวนการหมัก ABE โดย *Clostridium* sp. G10 เปรียบเทียบการใช้เปลือกเผือกกับ กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; (a) การเจริญเติบโตของเซลล์; (b) pH; (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; (d) ปริมาณบิวทานอล; (e) ปริมาณตัวทำละลายทั้งหมด; ◆ สารละลายจากการย่อยเปลือกเผือก; ■ น้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 (ต่อ) กระบวนการหมัก ABE โดย *Clostridium* sp. G10 เปรียบเทียบการใช้เปลือกเหือกกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน; (a) การเจริญเติบโตของเซลล์; (b) pH; (c) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์; (d) ปริมาณเอทานอล; (e) ปริมาณตัวทำละลายทั้งหมด, ◆ สารละลายจากการย่อยเปลือกเหือก; ■ น้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 4.9 การผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ โดยใช้เปลือกเผือกกับกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร T6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

เวลา (วัน)	ความเข้มข้นของตัวทำละลายในอาหาร T6 (กรัมต่อลิตร)			
	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)		ตัวทำละลายทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	
	เปลือกเผือก	กลูโคส	เปลือกเผือก	กลูโคส
0	0.58±0.68 ^s	0.05±0.04 ^s	1.57±0.51 ⁱ	0.20±0.09 ^j
1	2.43±0.89 ^f	5.92±0.92 ^e	5.36±1.21 ^h	7.59±0.69 ^s
2	6.21±0.81 ^e	8.06±0.02 ^d	8.76±0.11 ^{fg}	9.84±0.91 ^f
3	9.21±1.03 ^c	9.87±0.05 ^{bc}	11.19±0.48 ^e	11.85±0.04 ^{cde}
4	9.51±0.74 ^{bc}	10.27±0.06 ^{bc}	11.67±0.21 ^{de}	12.75±0.05 ^{abcd}
5	10.03±1.06 ^{bc}	11.56±0.07 ^a	12.40±0.48 ^{bcde}	14.11±0.08 ^a
6	10.45±0.76 ^b	11.62±0.05 ^a	13.14±0.32 ^{abc}	14.03±0.06 ^a
7	10.67±0.57 ^{ab}	9.69±0.02 ^{bc}	13.37±0.39 ^{ab}	11.35±0.09 ^e

หมายเหตุ: a-j ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ แสดงค่าความเข้มข้นของบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

คัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่มีความสามารถในการผลิต ABE จากตะกอนดินในแหล่งน้ำนิ่ง และดินเพาะปลูกทางการเกษตร สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 410 ไอโซเลต โดยการสังเกตลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น สี ความขุ่น ลักษณะขอบ ความโปร่งแสง และขนาด แต่มีเพียง 115 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการผลิตแก๊ส เซลล์เป็นรูปท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ได้ และสามารถผลิตอะซิโตนได้ และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว T6 (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร) พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลนั้นมีทั้งหมด 84 ไอโซเลต โดยที่ไอโซเลต G10 สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด คือ 5.89 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.06 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.52 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือไอโซเลต H5 สามารถผลิตบิวทานอลได้ คือ 2.39 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 6.90 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 3.74 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.76 กรัมต่อลิตร) ซึ่งคัดแยกได้จากตะกอนดินในแหล่งน้ำ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 มีลักษณะเป็นรูปท่อน ย้อมติดแกรมบวก สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่อยู่บริเวณปลายเซลล์ทำให้เซลล์บริเวณนั้นบวมเล็กน้อย และจากการสังเกตลักษณะโคโลนีบนเพลทอาหารแข็ง RCM พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ถึง 10 มิลลิเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม ขอบมีลักษณะขรุขระ มีสีขาวอมเทา กึ่งโปร่งแสงจนถึงทึบแสง ผิวเรียบเนียนและมันวาว และลักษณะโคโลนีของไอโซเลต G10 บนอาหาร Blood agar มีลักษณะเป็นสีขาวยุ่น ทึบแสง และไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นจึงพิจารณาได้ว่าเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ไม่เป็นเชื้อที่ทำให้ก่อโรค (γ -hemolytic) ในขณะที่ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* sp. H5 เป็นสีขาว ทึบแสง ผิวเรียบเนียนและมันวาว รูปร่างกลม ขอบขรุขระ และโคโลนีมีขนาดเล็กประมาณ 1.5 มิลลิเมตรหรือน้อยกว่า

เมื่อระบุสายพันธุ์เชื้อ *Clostridium* spp. ไอโซเลต G10 และ H5 ด้วยยีน 16S rRNA โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทป์ในฐานข้อมูล EzBioCloud พบว่าไอโซเลต G10 มีความใกล้เคียงกับ *C. diolis* DSM 5431 99.30 เปอร์เซ็นต์ และ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 99.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต H5 มีความใกล้เคียงกับ *C. diolis* DSM 5431 99.93 เปอร์เซ็นต์ และ *C. beijerinckii* NCIMB 8052 99.79 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถใช้ไซโลส (xylose) กลูโคส (glucose) แมนโนส (mannose) เซลโลไบโอส (cellobiose) มอลโตส (maltose) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methylglucopyranoside) และทรีฮาโลส (trehalose) ได้ แต่ไม่มีความสามารถในการใช้ไรโบส (ribose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลีเซอรอล (glycerol) อินอซิทอล (inositol) และแรมโนส (rhamnose) ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต มีความแตกต่างจาก *C. beijerinckii* คือ ไม่สามารถใช้ อินอซิทอล (Inositol) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลต มีความแตกต่างจาก *C. diolis* คือสามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ จึงไม่สามารถจัดจำแนก มีเพียงไอโซเลต G10 ที่ไม่สามารถใช้แลคโตส (lactose) และมีความสามารถในการรีดิวซ์ในเตรทให้เปลี่ยนเป็นไนไตรท์ได้ และไอโซเลต H5 สามารถใช้อะราบิทอล (L- arabitol) ได้เพียงสายพันธุ์เดียว

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักทั้งหมด 3 ปัจจัยคือสูตรอาหาร ความเข้มข้นน้ำตาล และค่า pH เริ่มต้น ได้ผลดังนี้ อาหาร RCM เป็นอาหารที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุด และ T6 เป็นอาหารที่สามารถผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายได้สูงที่สุดคือ 13.49 กรัมต่อลิตร และ 16.22 กรัมต่อลิตร (อะซิโตน 2.63 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.10 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ จึงคัดเลือกอาหาร T6 มาใช้ในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ที่ pH เริ่มต้น 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 พบว่าที่ pH เริ่มต้น 6.0 ให้ผลผลิตบิวทานอลและตัวทำละลายทั้งหมดสูงที่สุดคือ 12.04 และ 14.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นในการศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสที่แตกต่างกันจึงไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหาร และพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตบิวทานอลสูงที่สุดคือ 11.64 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมดคือ 14.05 และ 13.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว จึงได้นำมาปรับใช้กับกระบวนการหมักโดยใช้เปลือกเปลือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบ ซึ่งจากการย่อยเปลือกเปลือกด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างแอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส และ ACCELLERASE 1500 สามารถย่อยได้น้ำตาลรีดิวซ์ 64.23 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาหมักโดยการเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้กลูโคสในการหมักให้ผลผลิตบิวทานอล 11.62 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมดคือ 14.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งมีค่ามากกว่าการหมักโดยใช้สารละลายเปลือกเปลือกเล็กน้อยคือ 10.67 กรัมต่อลิตร และตัวทำละลายทั้งหมด 13.37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นจึงสามารถผลิตบิวทานอลโดยเชื้อ *Clostridium* sp. G10 ที่คัดแยกได้ และใช้เปลือกเปลือกซึ่งเป็นของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตบิวทานอลได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในขั้นตอนการแยกเชื้อจากตัวอย่างควรใช้วิธีการ spread plate แทนการ streak plate เนื่องจากในการ streak plate นั้นเชื้อที่มีจำนวนมากหรือมีการเจริญเติบโตได้ดีจะยับยั้งเชื้อที่มีจำนวนน้อยหรือมีการเจริญเติบโตได้ช้า จึงทำให้เชื้อบางสายพันธุ์ถูกยับยั้งการเจริญจึงไม่สามารถแยกได้

5.2.2 ในขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวทำละลายควรทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.3 วิเคราะห์ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนเพิ่ม เช่น ราวฟิโนส เพื่อนำมาใช้ในการจัด
จำแนกเชื้อได้ชัดเจนขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ณัฐพงษ์ ดิษฐกุลชัยมงคล และ เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์. 2558. “การศึกษาประสิทธิภาพและต้นทุนในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์.” รายงานการวิจัยสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ทิพวรรณ แดงสวน. 2554. “การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร.” รายงานการวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นวลจันทร์ ข้องสาย และสุวิญา เหลืองวีรชัย. 2548. “การศึกษาผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน โดย *Clostridium acetobutylicum* TISR 1462.” รายงานการวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- นันทนา อรุณฤกษ์. 2549. การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเดียน-สโตร์.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ตัดแปลคาร์โบไฮเดรตอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่: เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม. มหาสารคาม : อธิชาติการพิมพ์
- ภูมิหทัย คูประเสริฐยิ่ง และประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์. 2554. “การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสเพื่อการผลิตเอทานอล.” *สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย*. 1 (2) : 1-11
- ศศิวิมล แสงผล, เชษฐัฐ สาทรกิจ และทยา เจนจิตติกุล. 2546. เผือก. กรีนไฮเปอร์มาร์ท สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซูเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : www.sc.mahidol.ac.th
- รัชพล พะวงศ์รัตน์. 2558. “กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส.” รายงานการวิจัยสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ไสว พงษ์เก่า ไสภณ สินธุประมา และสิรินทร์ ช่วงโชติ. 2523. “เผือก.” *สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ ๕*
- สมใจ ศิริโชค. 2550. *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเพื่อสุขภาพ
- สิริมา สัตย์ชาพงษ์ อภิญญา สุทธิสารศักดิ์ และอรวรรณ เทียบภู. 2558. “การปรับสภาพและย่อยเปลือกเผือกด้วยเอนไซม์เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792.”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- สุขใจ ชูจันทร์. 2554. การผลิตกรดอินทรีย์ จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อรษา สุตเธียรกุล และเฟื่องฟ้า อุตราชติกิจ. 2558. **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: บุญศิริการพิมพ์
- อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. “พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง.” *วารสารสิ่งแวดล้อมจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*. 16(2) : 36-42
- Abd-Alla, A. M. H. and El-Enany, W. E. 2012. “Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*.” *Biomass Bioenergy*. 42 : 172-178
- Abd-Alla, M. H. Zohri, A. A. El-Enany, A. E. Ali, S. M. 2015. “Acetone-butanol-ethanol production from substandard and surplus dates by Egyptian native *Clostridium* strains.” *Anaerobe*. 32 : 77-86.
- Akin, D.E. Rigsby, L. L. Sethuramam, A. Morrison W. H. Gamble, G. R. and Eriksson, K. E. L. 1995. “Alteration in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white-rot fungi *Ceriporiopsis-Sobvermidpora* and *Cyathus-Stercoreus*.” *Applied and Environmental Microbiology*. 61 : 1591-1598
- Al-Shorgani, N. K. N. Ali, E. Kalil, M. S. and Yusoff, W. M. W. 2011. “Bioconversion of Butyric Acid to Butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) in a Limited Nutrient Medium.” *BioEnergy Research*. 5 : 287–293
- Al-Shorgani, N. K. N. Isa, M. H. M. Yusoff, W. M. W. Kalil, M. S. and Hamid, A. A. 2015. “Biobutanol production by a new aerotolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* YM1 under aerobic conditions.” *Fuel*. 158 : 855–863.
- Al-Shorgani, N. K. N. Isa, M. H. M. Yusoff, W. M. W. Kalil, M. S. and Hamid, A. A. 2016a. “Isolation of a *Clostridium acetobutylicum* strain and characterization of its fermentation performance on agricultural wastes.” *Renewable Energy*. 86 : 459-465.
- Al-Shorgani, N. K. N. Shukor, H. Abdeshahian, P. Kalil, M. S. Yusoff, W. M. W. Hamid, A. A. 2016b. “Enhanced butanol production by optimization of medium parameters

- using *Clostridium acetobutylicum* YM1.” *Saudi Journal of Biological Sciences*. 86 : 459-465.
- An, D. Deng, X. and Dong, Z. 2005. “Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos Taurus*) estimated by 16S rRNA homology analyses.” *Anaerobe*. 11 : 207-215.
- Annous BA and Blaschek HP. 1991. “Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity.” *Applied and Environmental Microbiology*. 57 : 2544–2548
- Atlas R.M. 2010. **Handbook of Microbiological Media**. 4th ed. London, Taylor & Francis.
- Atsumi, S. Hanai, T. and Liao, J. C. 2008 “Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels.” *Nature*. 451 : 86-89,.
- Badr, H. R. Toledo, R. and Hamdy, M. K. 2001. “Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*.” *Biomass and Bioenergy*. 20 : 119-132.
- Bahl, H. Andersch, W. and Gottschalk, G. 1982. “Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat.” *Applied Microbiology and Biotechnology* . 15 : 201-205.
- Barrow, G. and Feltham, R. 1993. **Manual for the Identification of Medical Bacteria**. Cambridge, Cambridge University Press.
- Bastawde, K. B. 1992. “Xylan structure microbial xylanases, and their mode of action.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8 : 353-368
- Beesch, S. C. 1953. “Acetone-butanol fermentation of starches.” *Journal of Applied Microbiology*. 1 : 85-96.
- Bhat, M. K. 2000. “Cellulases and related enzymes in biotechnology.” *Biotechnology Advances*. 18 (5) : 355–383.
- Biebl, H. and Spröer, C. 2003. “In Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53 : 627-628.
- Borneman, J. and Triplett, E.W. 1997. “Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms.” *Applied and Environmental Microbiology*. 63 : 2647-2653.

- Brill, J.A. and Wiegel, J. 1997. "Differentiation between sporeforming and asporogenous bacteria by a PCR and Southern hybridization based method." *Journal of Microbiological Methods*. 31 : 29–36.
- Cai, J. Wu, Q. Wang, G. Deng, C. 2013. Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill. *Renewable Energy*. 59 : 202-209
- Calam, C.T. 1980. "Isolation of *Clostridium acetobutylicum* strains producing butanol and acetone." *Biotechnology Letters*. 2 : 111-116.
- Campos, E. Qureshi, N. and Blaschek, H. 2002. "Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98(100) : 553-561.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N. 2001. **Microbiology a laboratory manual**, 6th. San Francisco, Benjamin Cummings.
- Cato, E.P. George, W.L. and Finegold, S.M. 1986. Genus *Clostridium*. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. Baltimore, The Williams & Wilkins Co.
- Chesson, A. 1987. **Supplementary enzymes to improve the utilization of pig and poultry diets**. London, Butterworths
- Chua, T. K. Liang, D.W. Qi, C. Yang, K.L. and He, J. 2013. "Characterization of a butanol–acetone-producing *Clostridium* strain and identification of its solventogenic genes." *Bioresource Technology*. 135 : 372–378
- Collee, J. Duddid, J. Fraser, A. 1989. **Mackie and McCartney Practics Madical Microbiology**. Churchill livingstone, Medical division of Longman Group UK Limited.
- Collins, M.D. Lawson, P.A. Willems, A. J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, J. Garcia, P. Cai, J. Hippe, H. Farrow, J.A. 1994. "The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations." *Journal of Bacteriology*. 44 : 812-826.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1989. **Biotechnology: A Texbook of Industrial Microbiology**. 2nd ed. Sunderland, Ma: Sinauer Associates, Inc.
- Cseke, L. J. Kaufman, P. B. Podila, G. K. and Tsai, C. J. 2004. **Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine**. 2nd ed. Boca Raton, Florida, CRC Press LLC.

- Davis, S. E. and Morton, S. A. III. 2008. "Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water." *Separation Science and Technology*. 43 : 2460-2472.
- de Boer, J. H. Verhagen, C. Bruinenberg, M. 1996. "Serology of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis." *American Journal of Ophthalmology*. 121 : 650-658.
- Demirbas, A. 2008. "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections." *Energy Conversion and Management*. 49 : 2106-2116.
- Durbin, R. Eddy, S. Krogh, A. and Yong, P.H. 1990. "Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Streptomyces griseus* sub sp. Grieus." *Nucleic Acids Research*. 19 : 1149
- Dürre, P. 2007. "Biobutanol: an attractive biofuel." *Biotechnology Journal*. 2 : 1525-1534.
- Dürre, P. 2008. "Fermentative butanol production." *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125 : 353-362.
- Ennis, B. M. and Maddox, I. S. 1989. "Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using immobilized cell of *Clostridium acetobutylicum* in a packed bed reactor and integration with product removal by pervaporation." *Biotechnology and Bioengineering*. 38 : 518-527.
- Euzéby, J.P. 1997. "List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 47(2) : 590-592.
- Euzéby, J.P. 2014. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature e Genus *Clostridium***. [Online]. Available: <http://www.bacterio.cict.fr/c/clostridium.html>.
- Felsenstein, J. 1985. "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap." *Evolution*. 39 : 783-791.
- Festucci-Buselli, R. A. Otoni, W. C. Joshi, C. P. 2007. "Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. Brazillian Journal of Plant Physiology." *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19 : 1-13.
- Formanek, J. 1 Mackie, R. and Blaschek, H. P. 1997. "Enhanced butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose." *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (6) : 2306-2310.

Fridovich, I. 1978. "The biology of oxygen radicals." *Science*. 201 : 875-880.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gabriel, C. L. 1928. "Butanol fermentation process." *Industrial & Engineering Chemistry*. 20 : 1063-1067.
- George, H. A. and Chen, J. S. 1983. "Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (synonym, *C. butylicum*)." *Applied and Environmental Microbiology*. 46 : 321-327.
- Gibas, C. and Jambeck, P. 2001. *Developing Bioinformatics Computer Skills*. USA. O'Reilly & Associates.
- Glazer, A. N. and Nikaido, H. 2007. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- Gottwald, M. Hippe, H. and Gottschalk, G. 1984. "Formation of n-butanol from D-glucose by strains of "*Clostridium tetanomorphum*" group." *Applied and Environmental Microbiology*. 48 : 573-576.
- Gram, C. 1884. The Differential Staining of *Schizomycetes* in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschritte der Medicin*. 2 : 185-189.
- Gregory, E. Veltri, B. Wagner, D. and Wilkins, T. 1977. "Carbohydrate repression of catalase synthesis in *Bacteroides fragilis*." *Journal of Bacteriology*. 129 : 534-535.
- Hansen, A. C. Zhang, Q. and Lyne, P. W. L. 2005. "Ethanol diesel fuel blends a review." *Bioresourcetechnology*. 96 : 277-285.
- Hartmanis, M. G. N. Klason, T. and Gatenbeck, S. 1984. "Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 20 : 66-77.
- Hastings, J. H. J. 1978. Acetone-butyl alcohol fermentation. **Economic microbiology**. 2nd. New York, Academic Press, Inc.
- Hatakka, A. I. 1983. "Pretreatment of Wheat Straw by White-Rot Fungi for Enzymic Saccharification of Cellulose." *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 18 : 350-357
- Hippe, H. Andreesen, J.R. and Gottschalk, G. 1992. **The Prokaryotes**. 2nd ed. Vol. 2. New York, Springer-Verlag.
- Hizukuri, S. 1985, "Relationship between the Distribution of the Chain Length of Amylopectin and the Crystallite Structure of Starch Granules." *Carbohydrate Research*. 141 : 295-306.

- Hizukuri, S. 1988. "Recent advances in molecular structures of starch." *Denpun Kagaku*. 35 : 185–198.
- Holdeman, L.V. Cato, E.P. Moore, W.E.C. 1977. **Anaerobe Laboratory Manual**. 4rd. Blacksburg USA, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Holt, J. Krieg, N. Sneath, O. Staley, J. and Williams, S. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 2nd ed. Vol 3. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins :
- Huber, G. W. Iborra, S. and Corma, A. 2006. "Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering." *Chemical Reviews*. 106 : 4044-4098.
- Johnson, J.L. Francis, B.S. 1975. "Taxonomy of the clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species." *Journal of General Microbiology*. 88 : 229-244.
- Johnson, J. L. Toth, J. Santiwatanakul, S. and Chen, J.-S. 1997. "Cultures of *Clostridium acetobutylicum* from various collections comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other distinct types based on DNA±DNA reassociation." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 47 : 420-424.
- Jones, D. T. Westhuizen, A. V. D. Long, S. Allcock, E. R. Reid, S. J. and Woods, D. R. 1982. "Solvent production and morphological changes in *Clostridium acetobutylicum*." *Applied and Environmental Microbiology*. 43 : 1434-1439.
- Jones, D. T. and Woods, D. R. 1986. "Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological." *Reviews*. 50 : 484–524.
- Kheyrandish, M. Asadollahi, M. A. Jeyhanipour, A. Doostmohammadi, M. Rismani-Yazdi, H. Karimi, K. 2015. "Direct production of acetone–butanol–ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*." *Fuel*. 142 : 129–133
- Kumar, P. Barrett, D. M. Delwiche, M. J. and Stroeve, P. 2009. "Method for pretreatment of lignocelulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production." *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 48 : 3713-3729
- Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets." *Molecular Biology and Evolution*. 33 : 1870-1874.

- Karmakar, M. and Ray, R. R. 2011 “Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulase.” *Research Journal of Microbiology*. 6 (1) : 41-53
- Keis, S. Shaheen, R. and Jones, D. T. 2001. “Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51 : 2095–2103
- Klein, D. and Harlry, J. 2002. **Microbiology**. Cororado, Mcgraw-hill Company.
- Kobayashi, N.I. Tanoi, K. Hirose, A. Saito, T. Noda, A. Iwata, N. Nakano, A. Nakamura, S. and Nakanishi, T.M. 2011. “Analysis of the Mineral Composition of Taro for Determination of Geographic Origin.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 : 4412–4417
- Kristin, B. 2007. **Butanol an energy alternative? Ethanol Today**. [Online]. Available :http://www.ethanoltoday.com/andhttp://www.ethanol.org/pdf/contentmgmt/March_11_ET_secondary.pdf.
- Lane, D. J. Pace, B. Olsen, G. J. Stahl, D. A. Sogin, M. L. & Pace, N. R. 1985. “Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.” *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 82 : 6955–6959.
- Lee, S. F. Forsberg, C. W. and Gibbins, L. N. 1985. “Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*.” *Applied and Environmental Microbiology*. 50 : 1068–1076
- Lee, S.M.Cho, M. O. Park, C. H. Chung, Y.-C. Kim, J. H. Sang, B.I. and Um, Y. 2008a. “Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate.” *Energy and Fuels*. 22 : 3459-3464.
- Lee, S. Y. Park, J. H. Jang, S. H. Nielsen, L. K. Kim, J. and Jung, K. S. 2008b. “Fermentative butanol production by Clostridia.” *Biotechnology and Bioengineering*. 101 : 209-228.
- Lee, Y.E. Jain, M.K. Lee, C.Y. Lowe, S.E. and Zeikus, J.G. 1993. “Taxonomic distinction of saccharolytic thermophilic anaerobes: description of *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* gen. nov., sp. nov., and *Thermoanaerobacterium accharolyticum* gen. nov., sp. nov., reclassification of *Thermoanaerobium brockii*, *Clostridium thermosulfurogenes*, and *Clostridium thermohydrosulfuricum* E100-69 as *Thermoanaerobacter brockii* comb. nov., *Thermoanaerobacterium*

- thermosulfurigenes* comb. nov., and *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* comb. nov., respectively, and transfer of *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39e to *Thermoanaerobacter ethanolicus*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 43 : 41–51.
- Li, H. Luo, W. Gu, Q. Wang, Q. Hua, W. and Yu X. 2013. “Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine induction.” *Bioresource Technology*. 137 : 254–260
- Li, H Zhang, Q. Yu, X. Wei, L. and Wang, Q. 2016. “Enhancement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* SE25 through accelerating phase shift by different phases pH regulation from cassava flour.” *Bioresource Technology*. 201 : 148–155
- Liu, Y. Wang, W. Yang, J Zhou, C. Sun, J. 2013. “pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery.” *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 8 : 159 -167.
- Long, S. Jones, D. T. and Woods, D. R. 1984. “Initiation of solvent production, clostridial stage and endospore formation in *Clostridium acetobutylicum* P262.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 20 : 256-261.
- Ludwig, W. Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. 2009. **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3. 2nd ed. New York, Springer.
- Madiah, M.S. Ariff, A.B. Sahaid, K.M. Suraini, A.A. Karim, M.I.A. 2001. “Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17 : 567–576.
- Madiah, M. S. Tsuey, L. S. and Ariff, A. B. 2008. “The profile of enzymes relevant to solvent production during direct fermentation of sago starch by *Clostridium saccharobutylicum* P262 utilizing different pH control strategies.” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 13 : 33-39.
- MacFaddin, J. F. 1985 **Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria**. Vol. 1. Baltimore. Williams and Wilkins.
- MacFaddin, J. 2000. **Biochemical Tests for Identification of Medical bacteria**. Baltimore. Lippincott Williams & Wikins

- McCutchan, W. N. and Hickey, R. J. 1954. "The butanol-acetone fermentation." *Industrial Fermentation*. 1 : 347-388.
- McNeil, B. and Kristiansen, B. 1985. "Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*." *Biotechnology Letters*. 7 : 499-502.
- Miwa, T. 1975. "Clostridia in soil of the Antarctica". *Japanese Journal of Medical Science & Biology*. 28 : 201-213.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3) : 426-428
- Montoya, D. Spitia, S. Silva, E. and Schwarz, W. H. 2000. "Isolation of mesophilic solvent producing clostridia from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis." *Journal of Biotechnology*. 79: 117-126.
- Ndaba, B. Chiyanzu, I. and Marx, S. 2015. "Direct fermentation of sweet sorghum juice by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium tetanomorphum* to produce bio-butanol and organic acids." *Biofuel Research Journal*. 6 : 248-252.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. **Molecular Evolution and Phylgenetics**. New York. Oxford University Press, Inc.
- Niven, R. K., 2005. "Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 9 :535-555.
- O'Brien, R. W. and Morris, J. G. 1971, "The ferredoxin-dependent reduction of chloramphenicol by *Clostridium acetobutylicum*." *Journal of General Microbiology*. 67 : 265-271.
- Ogata, S. and Hongo, M. 1973. "Bacteria lysis of *Clostridium* species. I. Lysis of *Clostridium* species by univalent cation." *Journal of General Microbiology*. 19 : 251-256
- Onyenwoke, R.U. Brill, J.A. Farahi, K. and Wiegel, J. 2004. "Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (*Firmicutes*)." *Archives of Microbiology*. 182 : 182-192.
- Pandey, A. Nigam, P. Soccol, C.R. Soccol, V. T. Singh, D. and Mohan, R. 2000. "Advances in microbial amylases." *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31 : 135-152.
- Panitz, J.C. Zverlov, V.V. Pham, V.T.T. Sterzl, S. Schieder, D. Schwarz, W.H. 2013. "Isolation of a solventogenic *Clostridium* sp. strain: Fermentation of glycerol

- to n-butanol, analysis of the bcs operon region and its potential regulatory elements.” *Systematic and Applied Microbiology*. 37 : 1–9.
- Prévot, A.R. 1953. **Dictionnaire des Bactéries Pathogènes**. 2nd ed. Paris. Masson.
- Qadeer, M. A. Anjum, J. I. and Akhtar, R. 1980. “Biosynthesis of enzymes by solid substrate fermentation. Part II: Production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*.” *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 23 : 25-29.
- Robinson, GC. 1922. “A Study of the acetone and butyl alcohol fermentation of various carbohydrates.” *The Journal of Biological Chemistry*. 52 : 125-155.
- Ross, D. 1961. “The acetone-butanol fermentation.” *Prog.Ind. Microbiol.* 3 : 73-85.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. “The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.” *Molecular Biology and Evolution*. 4 : 406-425.
- Sambrook, J. Fritschi, EF. and Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sen, M. Akgul, A. Ozcan, M. 2001. “Golevez [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] yumrusunun fiziksel ve kimyasal ozellikleri ile kızartma ve pureye islenmesi.” *Turkish Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 25 : 427-432
- Smith, Jr. H. L. and Goodner, K. 1958. “Detection of bacterial gelatinases by gelatinagar plate methods.” *Journal of Bacteriology*. 76(6) : 662-665.
- Sneath, P. Mair, N. sharpe, M. and Holt, J. 1986. **Berger’s Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore. Lippincott Williams & Wikins
- Schardinger, F. 1905. “*Bacillus marcerans*, ein Aceton bildender Rottebacillus.” *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt.* 14 : 772-781.
- Schuster, K. C. van den Heuvel, R. Gutierrez, N. A. and Maddox, I. S. 1998. “Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.” *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49 : 669-676.
- Shin, Y. Kang, S. Paek, J. Jin, T. E. Song, H. S. Kim, H. Park, H. and Chang, Y. 2016. “*Clostridium kogasensis* sp. nov., a novel member of the genus *Clostridium*, isolated from soil under a corroded gas pipeline.” *Anaerobe*. 39 : 14-18.
- Stackebrandt, E. and Rainey, F.A. 1997. **The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis**. New York. Academic Press.

- Stackebrandt, E. Kramer, I. Swiderski, J. and Hippe, H. 1999. "Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*." *FEMS Immunology and Medical Microbiology. Medical Microbiology*. 24 : 253–258.
- Supavadee, C. 2004. "Assessing Microbial Diversity from local Soil Environments at Mahidol University." Salaya Campus and Bor Khlueng Hot Spring, Ratchaburi. Thesis for the Degree of Master of Science (Molecular Genetic Engineering). Mahidol University
- Tajima, K. Arai S. Ogata, K. Nagamine, T. Matsui, H. Nakamura, M. Aminov, R.I. and Benno, Y. 2000. "Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet." *Anaerobe*. 6 : 273-284.
- Tamura, K. Nei, M. and Kumar, S. 2004. "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method." *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 101 : 11030-11035.
- Thang, V. H. Kanda, K. and Kobayashi, G. 2010. "Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4." *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161 : 157–170.
- Tran, H. T. M. Cheirsilp, B. Hodgson, B. and Umsakul, K. 2010. "Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone–butanol–ethanol production from cassava starch." *Biochemical Engineering Journal*. 48 : 260-267.
- Van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. 1985. *Starch Conversion Technology*. New York. Marcel Dekker Inc.
- Vos, P. D. Garrity, G. M. Jones, D. Krieg, N. R. Ludwig, W. Rainey, F. A. Schleifer, K.-H. and Whitman W. B. 2009. **Bergey'S manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3. 2nd ed. New York. Springer.
- Wackett, L.P. 2008. "Biomass to fuels via microbial transformations." *Current Opinion in Chemical Biology*. 12 : 187-193.
- Walden, W. C. and Hentges, D. J. (1975). "Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*. 30 : 781-785.

- Wiegel, J. 1981. "Distinction between the Gram reaction and the Gram type of bacteria." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 31 : 88.
- Wiegel, J. Kuk, S.U. and Kohring, G.W. 1989. "*Clostridium thermobutyricum* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a cellulolytic culture, that produces butyrate as the major product. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 39 : 199–204.
- Wiegel, J. Tanner, R. and Rainey, F.A. 2006. **The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. Vol 4. New York. Springer.
- Woese, C. R. 1987. "Bacterial evolution." *Microbiol. Reviews*. 51 : 221-271.
- Yazdi, H. R. and Karimi, K. 2015. "Direct production of acetone–butanol–ethanol from waste starch by free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*." *Fuel*. 142 : 129–133
- Zhu, Y. and Yang, S.T. 2004. "Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*." *Biotechnology*. 110 : 143-151.
- Zimbro, M. J. Power, D. A. Miller, S. M. Wilson, G. E. Johnson, J. A. 2009. **Difco™ & Manual™ Manual of Microbiological Culture Media**, 2nd ed. Maryland, USA. Becton, Dickinson and Company.
- [Online]. Available : <http://eng.genetika.ru/aaa%20genetika/Articles/butanol.jpg> (วันที่สืบค้น 29 พฤษภาคม 2559)



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Reinforced Clostridial (RCM, Difco™) มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
น้ำแป้ง (Soluble starch)	1.0	กรัมต่อลิตร
เดกซ์โตรส (Dextrose)	5.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)	3.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น (Agar)	0.5	กรัมต่อลิตร

ซึ่งผงอาหาร RCM ปริมาณ 38 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร T6 ซึ่งดัดแปลงจากอาหาร TYA ตามการรายงานของ Ogata, *et al.* (1973) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	6.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	2.0	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.3	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมอะซิเตต	3.0	กรัมต่อลิตร
Cysteine hydrochloride	0.5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	30.0	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร ยกเว้นน้ำตาลกลูโคส นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย NaOH พร้อมกับการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนี้ เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลกลูโคสแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ

3. อาหาร GYCC (Glucose Yeast extract Casein Cysteine) ซึ่งดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Badr. *et al.* (2000) ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังต่อไปนี้

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	30.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์(Yeast extract)	5.0	กรัมต่อลิตร
เคซีนไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate)	15.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริก (Cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	กรัมต่อลิตร
เรซาซูริน (Resazurin)	0.001	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ของอาหาร ยกเว้นน้ำตาลกลูโคส นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลกลูโคสแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ

4. P2 medium ตามการรายงานของ Al-Shorgani. *et al.* (2016) มีองค์ประกอบ ดังนี้

อะซิเตตบัฟเฟอร์(Acetate buffer)		
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)		
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (4-aminobenzoic acid)	0.001	กรัมต่อลิตร
ไบโอติน (Biotin)	0.00008	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ นำมาละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร แล้วจึงกรองสารละลายด้วยตัวกรองสารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Mineral solution)		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MnSO ₄ .4H ₂ O	0.01	กรัมต่อลิตร
FeSO ₄ .5H ₂ O	0.01	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ นำมาละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงกรองสารละลายด้วยตัวกรองสารที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร

แหล่งอื่นๆ

น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	30.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์(Yeast extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
Cysteine	0.5	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายน้ำ 799 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำแต่ละส่วนของอาหาร P2 ที่เตรียมไว้มาผสมเข้าด้วยกัน ซึ่งประกอบไปด้วย อะซิเตตบัฟเฟอร์(Acetate buffer) 100 มิลลิลิตร สารละลายวิตามิน (Vitamin solution) 1 มิลลิลิตร สารละลายเกลือแร่ (Mineral solution) 100 มิลลิลิตรและแหล่งน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจน 799 มิลลิลิตร

5. อาหาร blood agar base (Atlas, 2010) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ผงวุ้น (Agar)	15.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตเน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
เลือดแกะ (Sheep blood)	50.0	มิลลิลิตร

ซึ่งส่วนประกอบของอาหาร ยกเว้นเลือดแกะ ละลายในน้ำ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส จึงเติมเลือดแกะลงไป ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงเพลท

6. Carbohydrate Fermentation Broth ดัดแปลงสูตรอาหารจาก Atlas (2010) มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	1.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตเน (Peptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phenol red	0.018	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลชนิดต่างๆหรือแป้ง	10	กรัมต่อลิตร

ซึ่งองค์ประกอบของอาหาร ยกเว้นน้ำตาล ละลายในน้ำปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 7.4 ± 0.2 และใส่หลอดดักก๊าซคว่ำในหลอดทดลอง เติมน้ำตาลแต่ละชนิด ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 7.4 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปิเปตน้ำตาลแต่ละชนิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารแต่ละหลอด ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร

สำหรับการอาหารทดสอบแป้ง ให้ซึ่งองค์ประกอบของอาหาร ยกเว้น Phenol red และเติมผงวุ้น (Agar) 15 กรัมต่อลิตร

8. Motility test medium (MacFaddin, 1985) มีส่วนประกอบ ดังนี้

ทริปโตน (Tryptone)	10.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้น (Agar)	5.0	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบของอาหารละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2 ปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Gelatin test medium (Zimbro. *et al.*, 2009) มีส่วนประกอบ ดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัมต่อลิตร
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัมต่อลิตร
เจลาติน (Gelatin)	120.0	กรัมต่อลิตร

ซึ่งส่วนประกอบของอาหารละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8 ± 0.2 ปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การย้อมแกรมและการย้อมสปอร์

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับย้อมสี

หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ปลายลูบเขี่ยเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารมาเพียงเล็กน้อย นำเชื้อมาผสมกันหยดน้ำ แล้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายออกเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ บนสไลด์ หรือเรียกว่าการเสมีียร์ (smear) ที่ให้รอยเสมีียร์แห้ง หลังจากนั้นทำการตรึง (fix) ให้เซลล์ติดแน่นกับแผ่นสไลด์ โดยการนำสไลด์มาลนผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อไม่ให้เซลล์หลุดออกไประหว่างย้อมสี

2. การย้อมแกรม (Gram stain) (Gram, 1884)

ทำการหยดสี crystal violet ลงบนสไลด์ให้ทั่วรอยเสมีียร์ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างสีออกด้วยแอมโมเนียมไอโอดีน แล้วหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ทั่วรอยเสมีียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที แล้วล้างไอโอดีนออกด้วยน้ำ และล้างอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนไม่มีสีติดออกมา (ล้างด้วยแอลกอฮอล์ ไม่เกิน 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำทันที) หลังจากนั้นย้อมทับ (counterstain) ด้วยสี safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งให้สไลด์แห้ง จึงนำมาตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

3. การย้อมสปอร์ (endospore stain)

วางตะแกรงสำหรับรองสไลด์ลงบนปีกเกอร์น้ำเดือดที่มีไอ วางสไลด์ที่มีเชื้อลงบนตะแกรง และหยดสี malachite green ให้ทั่วรอยเสมีียร์ ทิ้งไว้นาน 5 นาที และคอยเติมน้ำยาเพื่อไม่ให้สีแห้ง จากนั้นใช้ปากคีบจับสไลด์นำไปล้างเบาๆ ด้วยน้ำ ย้อมทับด้วยสี safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งให้สไลด์แห้ง จึงนำมาตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

1. Hucker's crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (ความเข้มข้นของสียอม 90 เปอร์เซ็นต์)	2	กรัม
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกัน แล้วทำการกรองผ่านกระดาษกรอง

2. Gram's iodine

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide (KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ใส่ Potassium iodide ลงในครกบดสาร เติมน้ำกลั่นให้ละเอียด 5-10 นาที เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร บดต่อ แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรอีก บดจนสารละลายหมด จึงเทสารใส่ขวด ใช้ น้ำกลั่นล้างครก และปรับปริมาตรให้ได้ 300 มิลลิลิตร

3. 10X TBE buffer

ชั่ง Tris-base 54 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติม Boric acid 27.5 กรัม ผสมเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่น EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เป็น 8.0 ผสมกัน และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียม 6X loading dye

เตรียม 6X loading dye ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยละลายโบรมิโนฟีนอลบลู 25 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 6.7 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 99 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 3.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Kovac's reagent

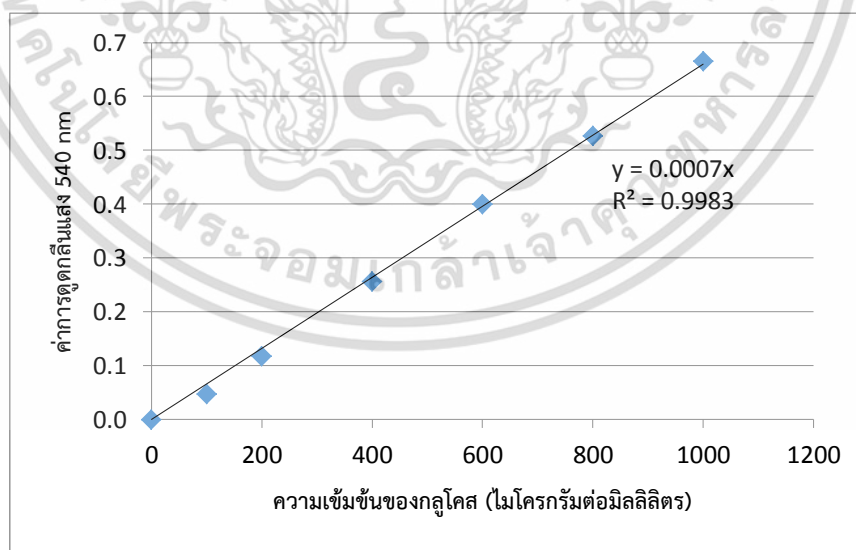
ซึ่งสาร p-dimethylaminobenzaldehyde 10 กรัม ละลายใน butyl alcohol หรือ isoamyl alcohol ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส จนละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม HCl เข้มข้น อย่างช้าๆ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา และอุณหภูมิต่ำ

6. สารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic (DNS) 1 เปอร์เซ็นต์ (Miller, 1959)

ซึ่งสาร 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ทีละเล็กน้อย (เตรียมโดยซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) คนให้สารละลายให้เข้ากัน จากนั้นค่อยๆ เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาทาลงไปจนครบ 300 กรัม พร้อมกับการคนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

นำผงกลูโคสไปอบที่ตู้อบ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 1000 800 600 400 200 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดปริมาณน้ำตาลตามวิธีการในหัวข้อ 3.3.2 และได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ค-1



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยการวัดด้วยวิธี DNS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. การเตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน

บิวทานอลความเข้มข้น 99.7 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล (MW) 74.12 กรัมต่อโมลและความหนาแน่น (d) 0.81 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นบิวทานอล (C_{Butanol}) จากสูตร

$$\begin{aligned} C_{\text{Butanol}} &= \frac{10 \times d \times \%}{\text{MW}} \\ &= \frac{10 \times 0.81 \times 99.7}{74.12} \\ &= 10.89 \text{ โมลต่อลิตร} \end{aligned}$$

เตรียมสารละลายบิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจากสูตร

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ 10.89 \times V_1 &= 1.0 \times 10 \\ V_1 &= (1.0 \times 10) / 10.89 \\ &= 0.92 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

เตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

ยกตัวอย่างการคำนวณที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} 1.0 \times V_1 &= 0.2 \times 10 \\ V_1 &= (0.2 \times 10) / 1.0 \\ &= 2 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น เตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

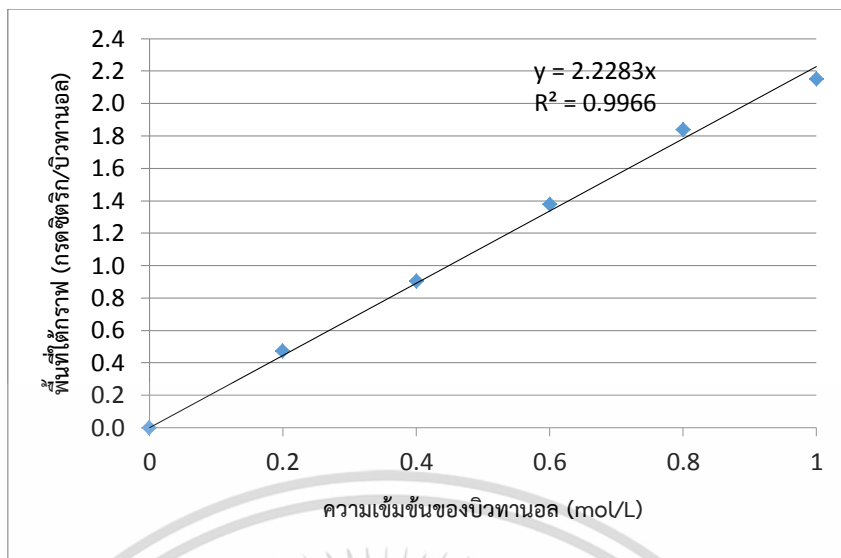
0.2 โมลต่อลิตรจะต้องใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

0.4 โมลต่อลิตรจะต้องใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

0.6 โมลต่อลิตรจะต้องใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

0.8 โมลต่อลิตรจะต้องใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

1.0 โมลต่อลิตรจะต้องใช้บิวทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานบิวทานอล ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

9. การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

เอทานอลความเข้มข้น 99.9 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล (MW) 46.08 กรัมต่อโมลและความหนาแน่น (d) 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นเอทานอล (C_{ETOH}) จากสูตร

$$C_{\text{ETOH}} = \frac{10 \times d \times \%}{\text{MW}}$$

$$= \frac{10 \times 0.789 \times 99.9}{46.08}$$

$$= 17.11 \text{ โมลต่อลิตร}$$

เตรียมสารละลายเอทานอล 1.0 โมลต่อลิตรปริมาตร (V) 100 มิลลิลิตรจากสูตร

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$17.11 \times V_1 = 1.0 \times 100$$

$$V_1 = \frac{(1.0 \times 100)}{17.11}$$

$$= 5.84 \text{ มิลลิลิตร}$$

เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

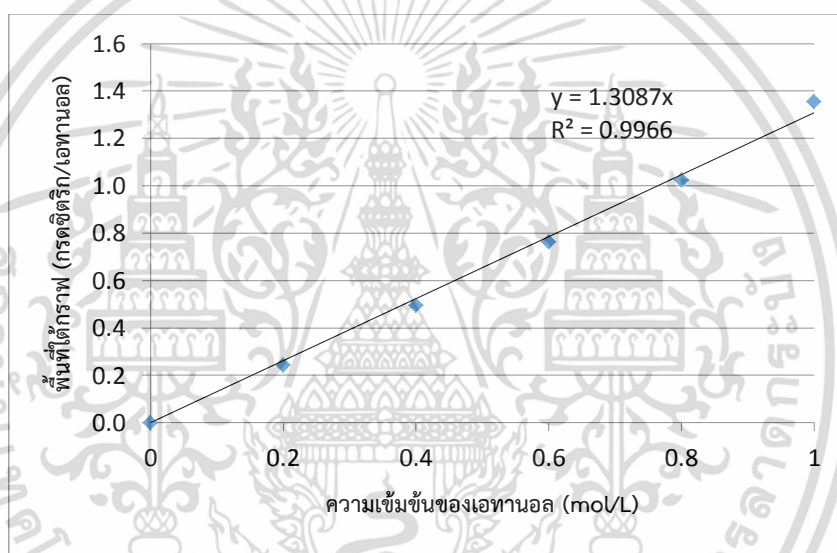
ยกตัวอย่างการคำนวณที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned}
 1.0 \times V_1 &= 0.2 \times 10 \\
 V_1 &= (0.2 \times 10) / 1.0 \\
 &= 2 \quad \text{มิลลิลิตร}
 \end{aligned}$$

ดังนั้น เตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- 0.2 โมลต่อลิตรจะต้องใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- 0.4 โมลต่อลิตรจะต้องใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- 0.6 โมลต่อลิตรจะต้องใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร
- 0.8 โมลต่อลิตรจะต้องใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
- 1.0 โมลต่อลิตรจะต้องใช้เอทานอล 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร



รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานเอทานอล ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

10. การเตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน

อะซิโตนความเข้มข้น 99.98 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล (MW) 58.08 กรัมต่อโมลและความหนาแน่น (d) 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

คำนวณความเข้มข้นอะซิโตน (C_{Acetone}) จากสูตร

$$\begin{aligned}
 C_{\text{Acetone}} &= \frac{10 \times d \times \%}{\text{MW}} \\
 &= \frac{10 \times 0.79 \times 99.98}{58.08} \\
 &= 13.59 \quad \text{โมลต่อลิตร}
 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมสารละลายอะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตรปริมาตร (V)100 มิลลิลิตรจากสูตร

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 13.59 \times V_1 &= 1.0 \times 100 \\ V_1 &= (1.0 \times 100) / 13.59 \\ &= 7.36 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

เตรียมสารละลายอะซิโตนมาตรฐาน 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลต่อลิตร

คำนวณจากสูตรมาตรฐาน

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

ยกตัวอย่างการคำนวณที่ความเข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตรให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

$$\begin{aligned} 1.0 \times V_1 &= 0.2 \times 10 \\ V_1 &= (0.2 \times 10) / 1.0 \\ &= 2 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้น เตรียมสารละลายบิวทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

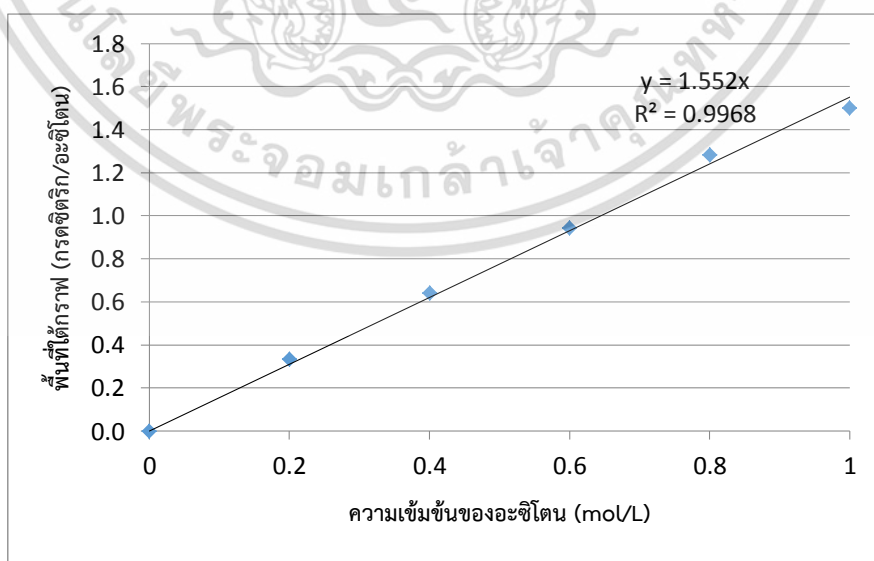
0.2 โมลต่อลิตรจะต้องใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

0.4 โมลต่อลิตรจะต้องใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

0.6 โมลต่อลิตรจะต้องใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

0.8 โมลต่อลิตรจะต้องใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร

1.0 โมลต่อลิตรจะต้องใช้อะซิโตน 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร



รูปที่ ค-4 กราฟมาตรฐานอะซิโตน ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

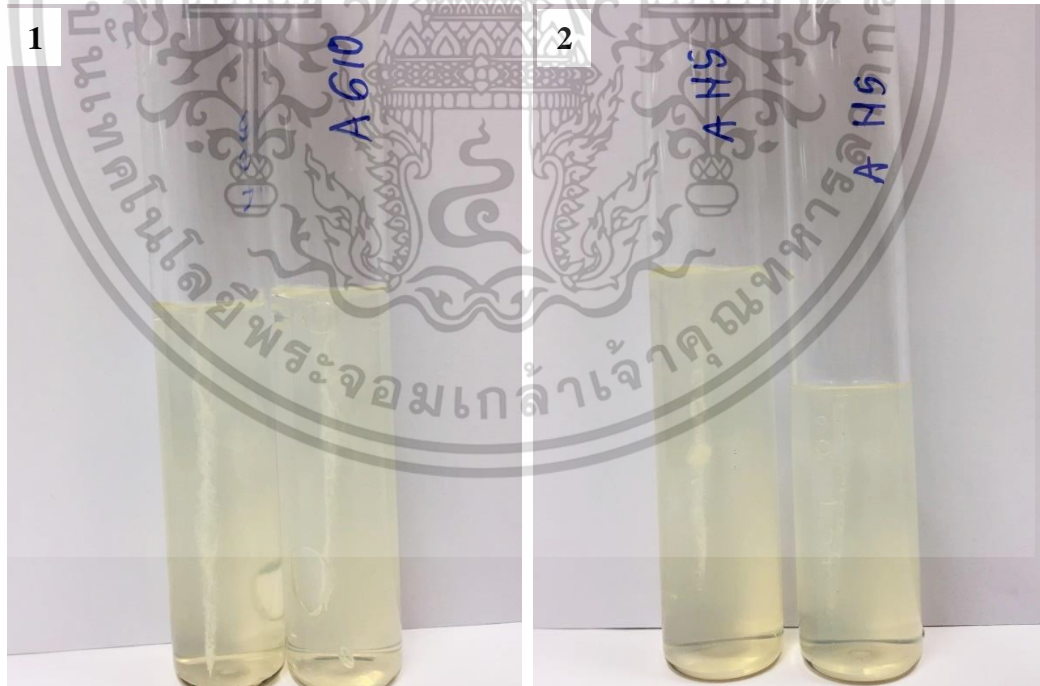
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การศึกษาลักษณะฟิโนไทป์

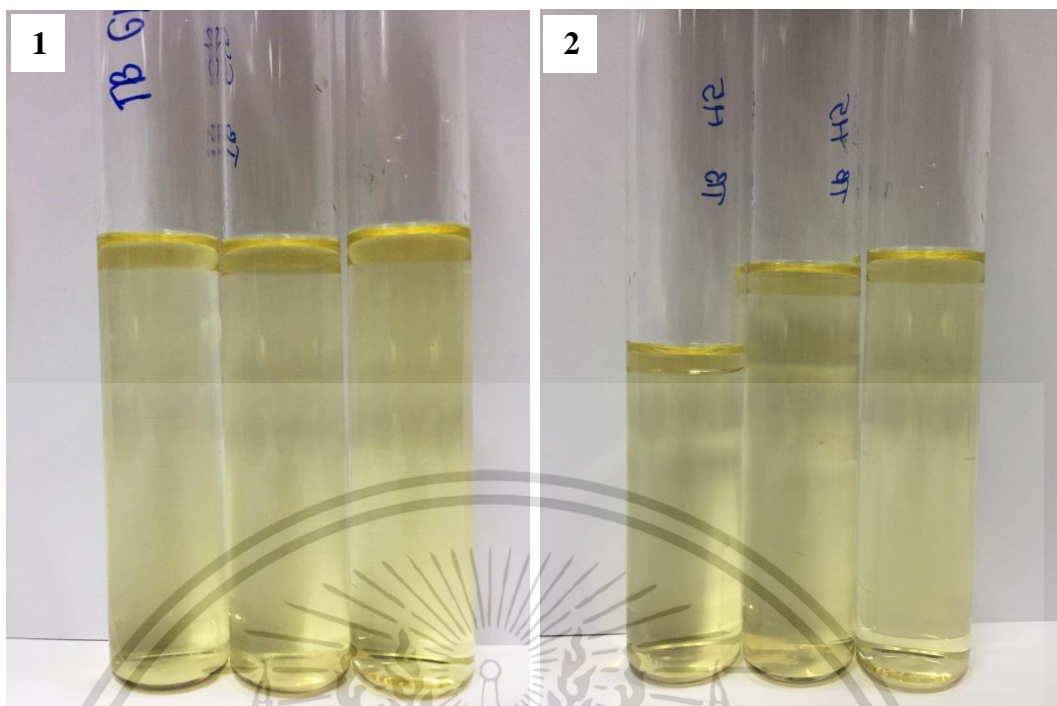


รูปที่ ง-1 การทดสอบการผลิตอะซิโตนของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลว RCM: A, เกิดการผลิตอะซิโตน; B, ไม่เกิดการผลิตอะซิโตน

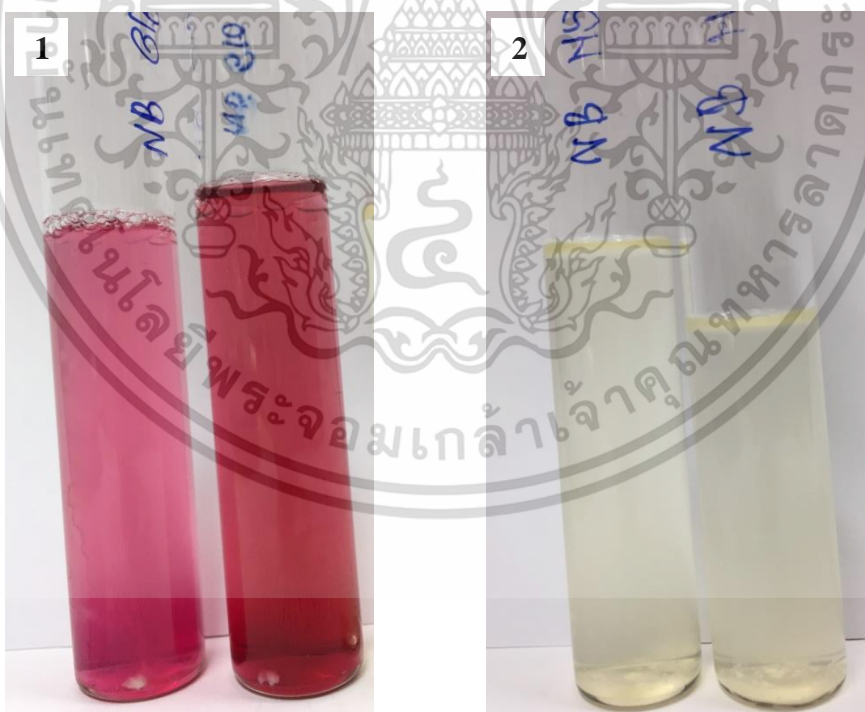


รูปที่ ง-2 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 (1) และ *Clostridium* sp. H5 (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

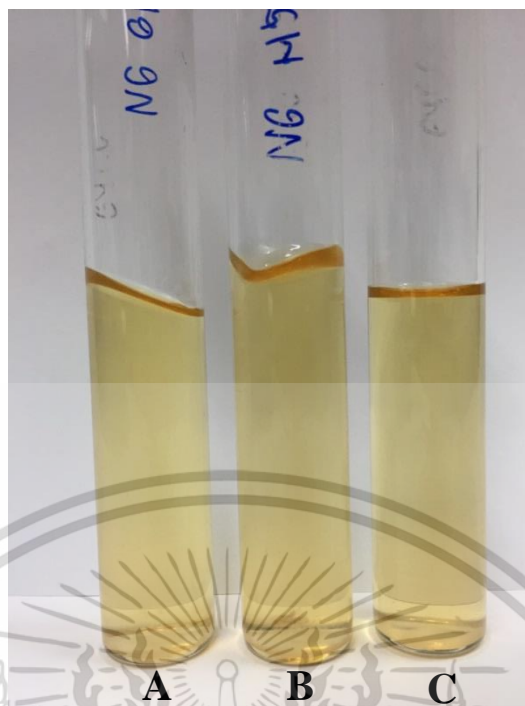


รูปที่ ง-3 ผลการทดสอบการสร้างสารอินโดล (Indole) ของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 (1) และ *Clostridium* sp. H5 (2)

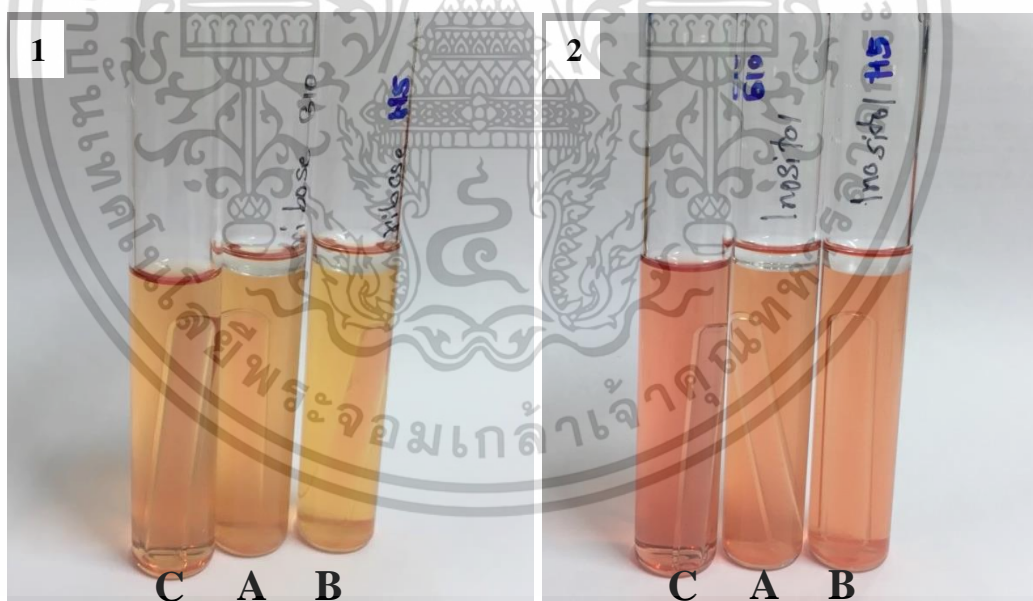


รูปที่ ง-4 ผลการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรทของเชื้อ *Clostridium* sp. G10 (1) และ *Clostridium* sp. H5 (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

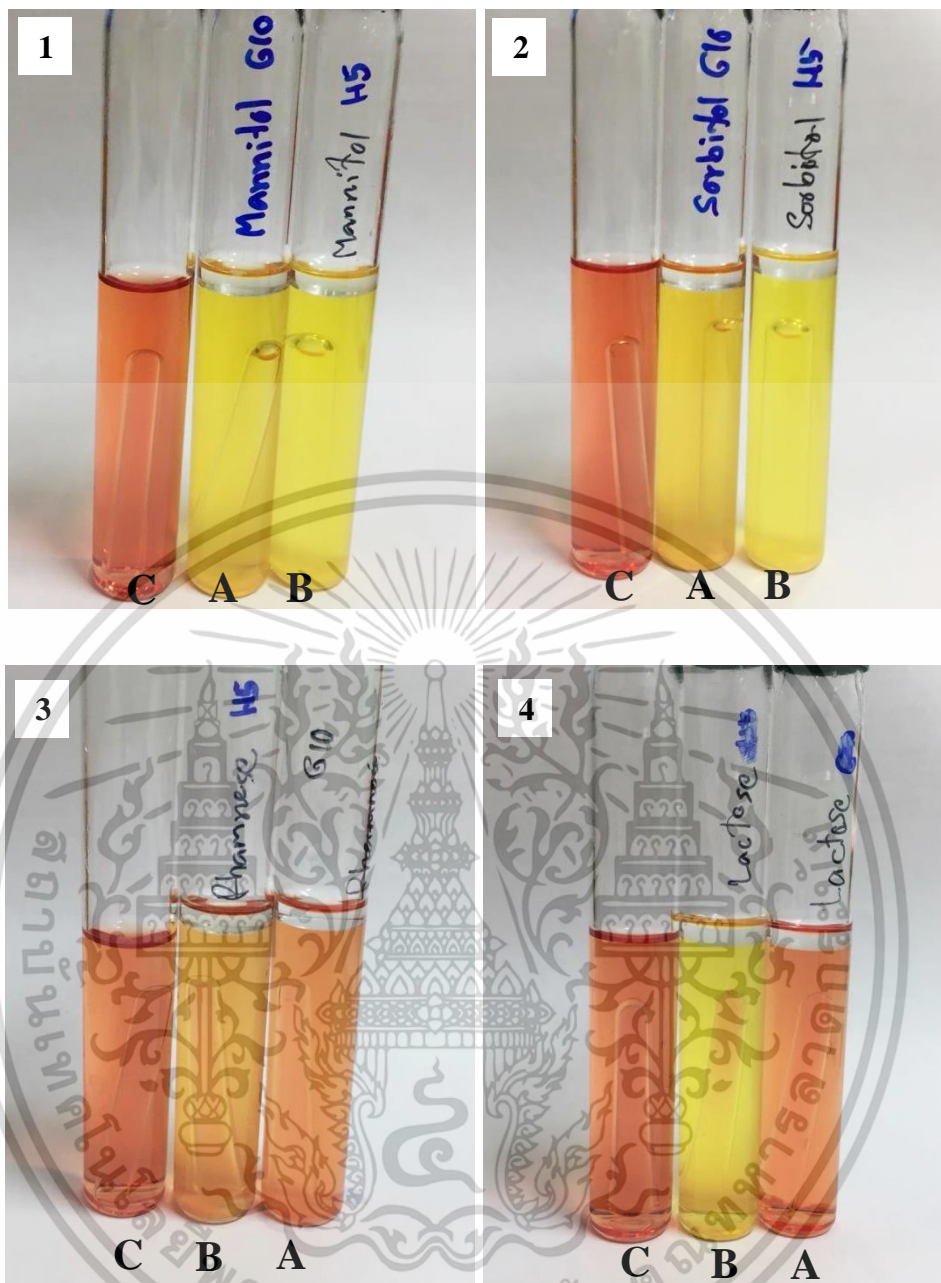


รูปที่ ง-5 ผลการทดสอบการย่อยเจลาติน (Gelatin): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5 ; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ



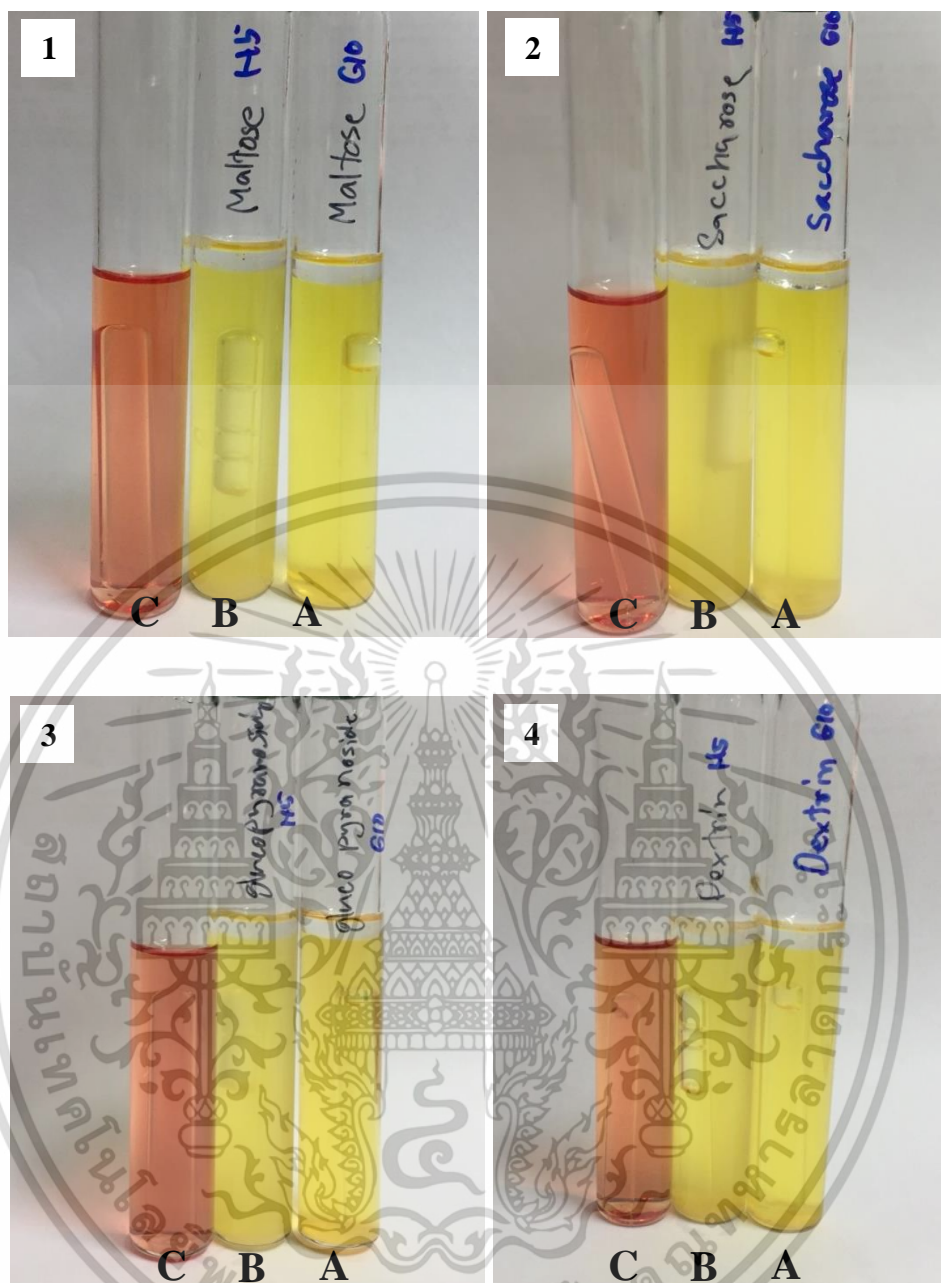
รูปที่ ง-6 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไรโบส (ribose) (1) และ อินอซิทอล (Inositol) (2): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



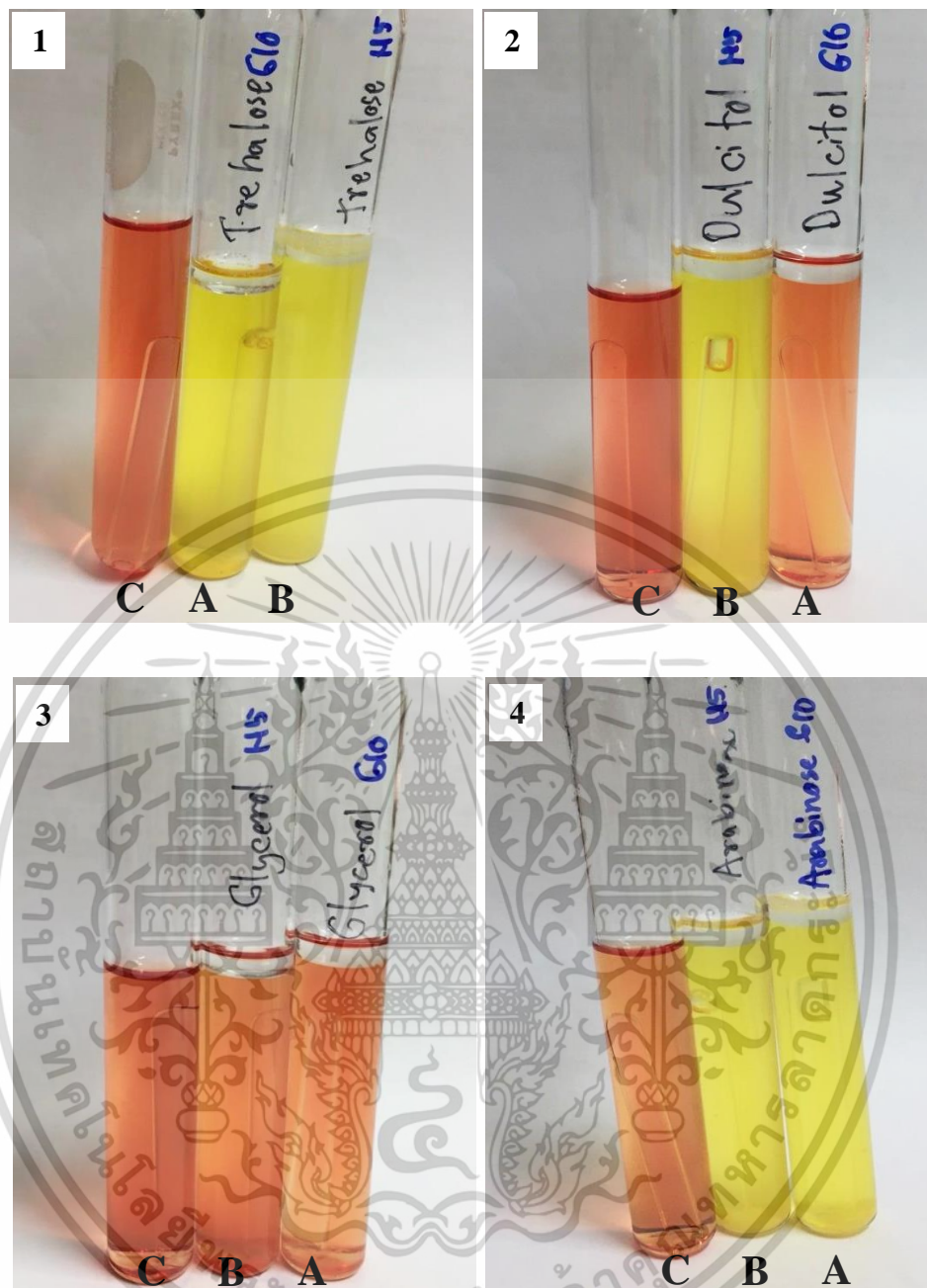
รูปที่ ง-7 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลแมนนิทอล (Mannitol) (1) ซอร์บิทอล (Sorbitol) (2) แรมโนส (Rhamnose) (3) และแลคโตส (Lactose) (4): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



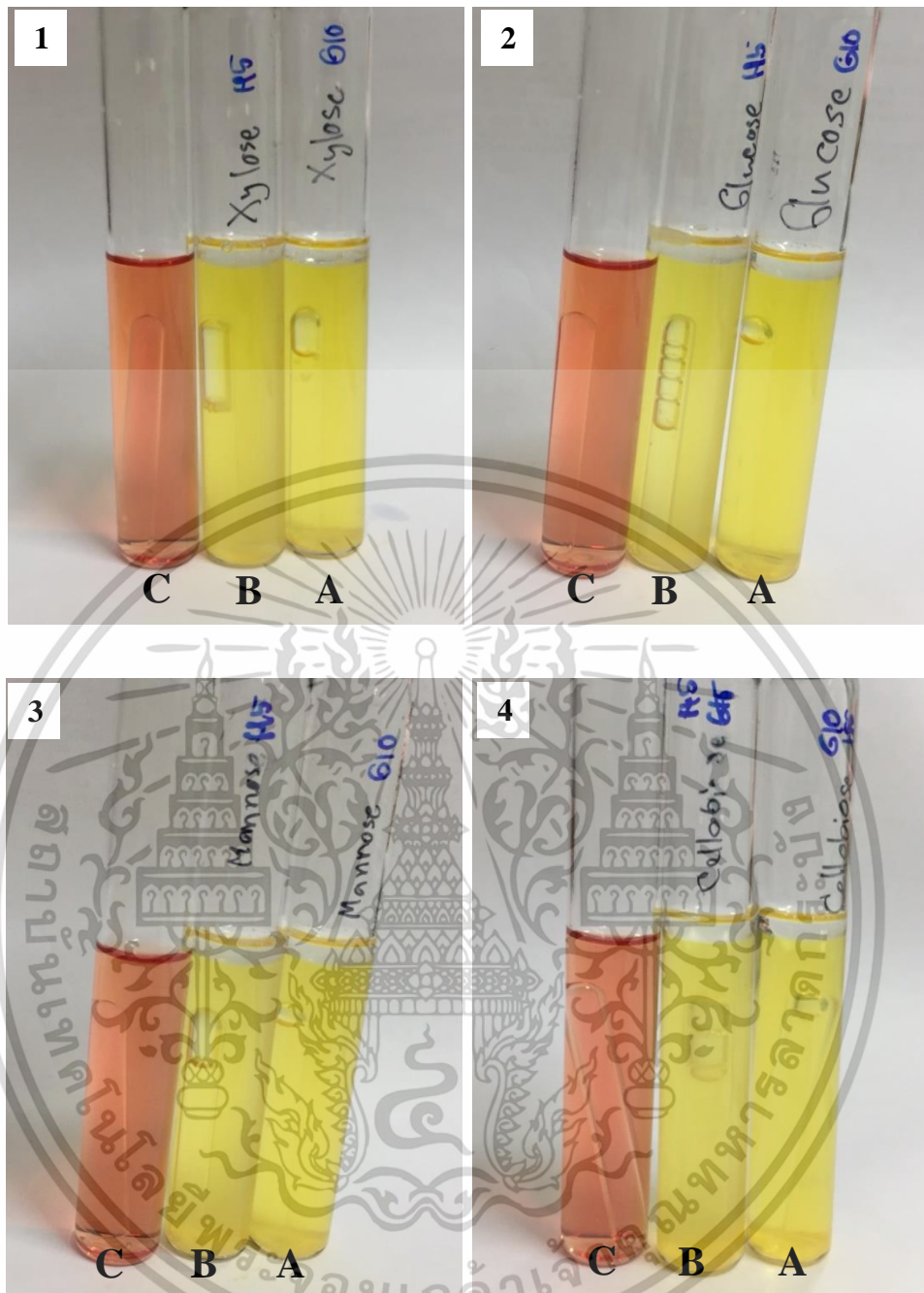
รูปที่ ง-8 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลมอลโตส (Maltose) (1) แซคคาโรส (Saccharose) (2) เมทิลกลูโคไพราโนไซด์ (methyl-glucopyranoside) (3) และเด็กซ์ตริน (Dextrin) (4): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๙-9 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลทรีฮาโรส (Threhalose) (1) ดัลซิทอล (Dulcitol) (2) กลีเซอรอล (Glycerol) (3) และอะราบินอส (Arabinose) (4): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๑-10 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโรส (Xylose) (1) กลูโคส (Glucose) (2) แมนโนส (Mannose) (3) และเซลโลไบโอส (Cellobiose) (4): A, *Clostridium* sp. G10; B, *Clostridium* sp. H5; C, ชุดควบคุม (Control) ที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

ตารางที่ จ-1 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร RCM ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Acetone								
D0	3	5.0767	.59677	.34454	3.5942	6.5591	4.39	5.47
RCM								
D1	3	6.2300	.24637	.14224	5.6180	6.8420	5.97	6.46
D2	3	6.5300	.04583	.02646	6.4162	6.6438	6.49	6.58
D3	3	2.7567	3.14185	1.81395	-5.0481	10.5615	.59	6.36
D4	3	5.3800	5.71745	3.30097	-8.8229	19.5829	.72	11.76
D5	3	6.8667	2.21507	1.27887	1.3641	12.3692	5.46	9.42
D6	3	6.2100	1.61025	.92968	2.2099	10.2101	4.53	7.74
D7	3	5.7267	.98571	.56910	3.2780	8.1753	4.60	6.43
Total	24	5.5971	2.44846	.49979	4.5632	6.6310	.59	11.76
Butanol								
D0	3	.2100	.02646	.01528	.1443	.2757	.18	.23
RCM								
D1	3	.3167	.08622	.04978	.1025	.5308	.24	.41
D2	3	.2900	.03464	.02000	.2039	.3761	.27	.33
D3	3	.6400	.42462	.24515	-.4148	1.6948	.38	1.13
D4	3	.6700	.29597	.17088	-.0652	1.4052	.47	1.01
D5	3	1.2067	1.05458	.60886	-1.4130	3.8264	.40	2.40
D6	3	1.7933	1.84430	1.06481	-2.7882	6.3748	.47	3.90
D7	3	2.1700	2.50402	1.44569	-4.0503	8.3903	.28	5.01
Total	24	.9121	1.20795	.24657	.4020	1.4222	.18	5.01
Ethanol								
D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
RCM								
D1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D5	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D6	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D7	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	24	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-1 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร RCM ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

		N	Mean	Std.	Std.	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Deviation	Error	Lower Bound	Upper Bound		
ABE RCM	D0	3	5.2900	.61733	.35642	3.7565	6.8235	4.58	5.70
	D1	3	6.5500	.28931	.16703	5.8313	7.2687	6.22	6.76
	D2	3	6.8167	.08327	.04807	6.6098	7.0235	6.75	6.91
	D3	3	3.4000	2.99040	1.72651	-4.0286	10.8286	1.00	6.75
	D4	3	6.0467	5.61308	3.24071	-7.8970	19.9903	1.25	12.22
	D5	3	8.0700	1.65103	.95322	3.9686	12.1714	6.54	9.82
	D6	3	7.9967	.55374	.31970	6.6211	9.3722	7.37	8.42
	D7	3	7.8967	1.52004	.87760	4.1207	11.6727	6.71	9.61
	Total	24	6.5083	2.52501	.51541	5.4421	7.5746	1.00	12.22
Glucose RCM	D0	3	37.2200	1.07699	.62180	34.5446	39.8954	36.29	38.40
	D1	3	30.5700	1.70361	.98358	26.3380	34.8020	28.74	32.11
	D2	3	29.2567	.89114	.51450	27.0429	31.4704	28.23	29.83
	D3	3	29.0467	1.00530	.58041	26.5494	31.5440	27.89	29.71
	D4	3	28.6300	1.43000	.82561	25.0777	32.1823	27.20	30.06
	D5	3	28.7033	1.61976	.93517	24.6796	32.7270	26.91	30.06
	D6	3	27.5200	.87881	.50738	25.3369	29.7031	26.51	28.11
	D7	3	27.0867	.59769	.34508	25.6019	28.5714	26.40	27.49
	Total	24	29.7542	3.21824	.65692	28.3952	31.1131	26.40	38.40
pH RCM	D0	3	5.9700	.00000	.00000	5.9700	5.9700	5.97	5.97
	D1	3	4.5500	.40706	.23502	3.5388	5.5612	4.08	4.79
	D2	3	4.7400	.01732	.01000	4.6970	4.7830	4.72	4.75
	D3	3	4.7433	.02082	.01202	4.6916	4.7950	4.72	4.76
	D4	3	4.7400	.01732	.01000	4.6970	4.7830	4.72	4.75
	D5	3	4.7333	.01155	.00667	4.7046	4.7620	4.72	4.74
	D6	3	4.7433	.00577	.00333	4.7290	4.7577	4.74	4.75
	D7	3	4.7367	.03055	.01764	4.6608	4.8126	4.71	4.77
	Total	24	4.8696	.44624	.09109	4.6812	5.0580	4.08	5.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-2 การเปรียบเทียบทางสถิติของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร RCM ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone RCM

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D3	3	2.7567
D0	3	5.0767
D4	3	5.3800
D7	3	5.7267
D6	3	6.2100
D1	3	6.2300
D2	3	6.5300
D5	3	6.8667
Sig.		.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol RCM

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D0	3	.2100
D2	3	.2900
D1	3	.3167
D3	3	.6400
D4	3	.6700
D5	3	1.2067
D6	3	1.7933
D7	3	2.1700
Sig.		.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE RCM

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D3	3	3.4000
D0	3	5.2900
D4	3	6.0467
D1	3	6.5500
D2	3	6.8167
D7	3	7.8967
D6	3	7.9967
D5	3	8.0700
Sig.		.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Glucose RCM

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D7	3	27.0867		
D6	3	27.5200		
D4	3	28.6300	28.6300	
D5	3	28.7033	28.7033	
D3	3	29.0467	29.0467	
D2	3	29.2567	29.2567	
D1	3		30.5700	
D0	3			37.2200
Sig.		.066	.093	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH RCM

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D1	3	4.5500	
D5	3	4.7333	
D7	3	4.7367	
D2	3	4.7400	
D4	3	4.7400	
D3	3	4.7433	
D6	3	4.7433	
D0	3		5.9700
Sig.		.166	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-3 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone T6	D0	3	.8467	1.43197	.82675	-2.7105	4.4039	.00	2.50
	D1	3	3.0000	.64506	.37242	1.3976	4.6024	2.35	3.64
	D2	3	2.8000	1.53353	.88538	-1.0095	6.6095	1.03	3.73
	D3	3	2.1700	.71631	.41356	.3906	3.9494	1.43	2.86
	D4	3	2.1400	1.03436	.59719	-.4295	4.7095	1.24	3.27
	D5	3	2.3467	1.17874	.68055	-.5815	5.2748	1.04	3.33
	D6	3	2.1433	.72016	.41579	.3544	3.9323	1.33	2.70
	D7	3	2.6300	.76210	.44000	.7368	4.5232	1.75	3.07
Total	24	2.2596	1.08010	.22047	1.8035	2.7157	.00	3.73	
Butanol T6	D0	3	.1067	.01155	.00667	.0780	.1354	.10	.12
	D1	3	2.6733	.61338	.35413	1.1496	4.1971	2.01	3.22
	D2	3	6.7400	1.38719	.80090	3.2940	10.1860	5.40	8.17
	D3	3	8.2900	3.10793	1.79436	.5695	16.0105	4.97	11.13
	D4	3	9.4133	1.51130	.87255	5.6591	13.1676	8.11	11.07
	D5	3	10.2967	2.38515	1.37707	4.3716	16.2217	7.69	12.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-3 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
	D6	3	12.6100	3.38248	1.95288	4.2074	21.0126	8.99	15.69
	D7	3	13.4900	2.48646	1.43556	7.3133	19.6667	10.69	15.44
	Total	24	7.9525	4.79176	.97811	5.9291	9.9759	.10	15.69
Ethanol T6	D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D3	3	.4033	.66425	.38351	-1.2468	2.0534	.00	1.17
	D4	3	.3067	.49692	.28690	-.9278	1.5411	.00	.88
	D5	3	.4500	.36056	.20817	-.4457	1.3457	.05	.75
	D6	3	.0700	.02000	.01155	-.0203	.1197	.05	.09
	D7	3	.0933	.01528	.00882	.0554	.1313	.08	.11
	Total	24	.1654	.32299	.06593	.0290	.3018	.00	1.17
ABE T6	D0	3	.9533	1.42637	.82352	-2.5900	4.4966	.10	2.60
	D1	3	5.6733	1.25480	.72446	2.5562	8.7904	4.36	6.86
	D2	3	9.5400	2.16377	1.24925	4.1649	14.9151	7.67	11.91
	D3	3	10.8633	3.38828	1.95622	2.4464	19.2803	7.83	14.52
	D4	3	11.8567	1.80976	1.04487	7.3610	16.3524	10.34	13.86
	D5	3	13.0967	3.92775	2.26769	3.3396	22.8537	8.78	16.46
	D6	3	14.8267	4.11425	2.37536	4.6063	25.0470	10.37	18.48
	D7	3	16.2100	3.25286	1.87804	8.1294	24.2906	12.51	18.62
	Total	24	10.3775	5.34787	1.09163	8.1193	12.6357	.10	18.62
Glucose T6	D0	3	32.8400	2.99271	1.72784	25.4057	40.2743	29.43	35.03
	D1	3	22.9367	1.22904	.70959	19.8836	25.9898	21.89	24.29
	D2	3	16.2700	1.02430	.59138	13.7255	18.8145	15.49	17.43
	D3	3	15.0100	1.42717	.82397	11.4647	18.5553	13.77	16.57
	D4	3	12.7600	1.19662	.69087	9.7874	15.7326	11.83	14.11
	D5	3	10.4367	.90118	.52030	8.1980	12.6753	9.51	11.31
	D6	3	9.0300	1.78782	1.03220	4.5888	13.4712	7.69	11.06
	D7	3	8.2500	2.54661	1.47028	1.9239	14.5761	6.03	11.03
	Total	24	15.9417	8.07416	1.64813	12.5322	19.3511	6.03	35.03
pH T6	D0	3	5.8200	.01000	.00577	5.7952	5.8448	5.81	5.83
	D1	3	5.4100	.02646	.01528	5.3443	5.4757	5.39	5.44
	D2	3	5.9700	.03000	.01732	5.8955	6.0445	5.94	6.00
	D3	3	6.0100	.05292	.03055	5.8786	6.1414	5.97	6.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-3 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D4	3	6.0600	.06928	.04000	5.8879	6.2321	6.02	6.14
D5	3	6.1900	.11533	.06658	5.9035	6.4765	6.06	6.28
D6	3	6.1900	.10000	.05774	5.9416	6.4384	6.09	6.29
D7	3	6.0667	.04933	.02848	5.9441	6.1892	6.01	6.10
Total	24	5.9646	.24893	.05081	5.8595	6.0697	5.39	6.29

ตารางที่ จ-4 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone T6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	3	.8467	
D4	3	2.1400	2.1400
D6	3	2.1433	2.1433
D3	3	2.1700	2.1700
D5	3	2.3467	2.3467
D7	3	2.6300	2.6300
D2	3	2.8000	2.8000
D1	3		3.0000
Sig.		.061	.387

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Butanol T6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.1067			
D1	3	2.6733			
D2	3		6.7400		
D3	3		8.2900		
D4	3		9.4133	9.4133	
D5	3		10.2967	10.2967	10.2967
D6	3			12.6100	12.6100
D7	3				13.4900
Sig.		.166	.082	.105	.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ethanol T6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D0	3	.0000
D1	3	.0000
D2	3	.0000
D6	3	.0700
D7	3	.0933
D4	3	.3067
D3	3	.4033
D5	3	.4500
Sig.		.148

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE T6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.9533			
D1	3	5.6733	5.6733		
D2	3		9.5400	9.5400	
D3	3		10.8633	10.8633	10.8633
D4	3			11.8567	11.8567
D5	3			13.0967	13.0967
D6	3			14.8267	14.8267
D7	3				16.2100
Sig.		.061	.051	.057	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

GlucoseT6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D7	3	8.2500					
D6	3	9.0300					
D5	3	10.4367	10.4367				
D4	3		12.7600	12.7600			
D3	3			15.0100	15.0100		
D2	3				16.2700		
D1	3					22.9367	
D0	3						32.8400
Sig.		.173	.130	.142	.400	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH T6

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D1	3	5.4100			
D0	3		5.8200		
D2	3			5.9700	
D3	3			6.0100	
D4	3			6.0600	
D7	3			6.0667	
D5	3				6.1900
D6	3				6.1900
Sig.		1.000	1.000	.118	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-5 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร GYCC ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Acetone D0	3	.1167	.02309	.01333	.0593	.1740	.09	.13
GYCC D1	3	2.7767	.13317	.07688	2.4459	3.1075	2.63	2.89
D2	3	2.8700	.26665	.15395	2.2076	3.5324	2.57	3.08
D3	3	2.8433	.37581	.21697	1.9098	3.7769	2.53	3.26
D4	3	3.1633	.71988	.41563	1.3750	4.9516	2.40	3.83
D5	3	3.5667	1.23715	.71427	.4934	6.6399	2.68	4.98
D6	3	3.5600	.33867	.19553	2.7187	4.4013	3.29	3.94
D7	3	3.5600	.60918	.35171	2.0467	5.0733	3.15	4.26
Total	24	2.8071	1.19377	.24368	2.3030	3.3112	.09	4.98
Butanol D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
GYCC D1	3	.4500	.21000	.12124	-.0717	.9717	.30	.69
D2	3	1.1967	.25166	.14530	.5715	1.8218	.93	1.43
D3	3	1.1000	.37802	.21825	.1609	2.0391	.82	1.53
D4	3	1.1867	.29704	.17150	.4488	1.9246	.95	1.52
D5	3	.8567	.48501	.28002	-.3482	2.0615	.37	1.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-5 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร GYCC ด้วยเชื้อ *Clostridium sp. G10*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
D6	3	.8833	.20232	.11681	.3807	1.3859	.65	1.01	
D7	3	.9833	.49116	.28357	-.2368	2.2034	.68	1.55	
Total	24	.8321	.47988	.09796	.6294	1.0347	.00	1.55	
Ethanol	D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.00	.00	
GYCC	D1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.00	.00	
	D2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.00	.00	
	D3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.00	.00	
	D4	3	.0400	.06928	.04000	-.1321	.2121	.00	.12
	D5	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D6	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D7	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	24	.0050	.02449	.00500	-.0053	.0153	.00	.12	
ABE	D0	3	.1167	.02309	.01333	.0593	.1740	.09	.13
GYCC	D1	3	3.2300	.28618	.16523	2.5191	3.9409	2.93	3.50
	D2	3	4.0600	.10440	.06028	3.8006	4.3194	3.99	4.18
	D3	3	3.9433	.34034	.19650	3.0979	4.7888	3.56	4.21
	D4	3	4.3567	.51588	.29784	3.0751	5.6382	3.93	4.93
	D5	3	4.4700	.87710	.50639	2.2912	6.6488	3.90	5.48
	D6	3	4.4433	.15567	.08988	4.0566	4.8300	4.28	4.59
	D7	3	4.5400	1.10041	.63532	1.8064	7.2736	3.87	5.81
Total	24	3.6450	1.49613	.30540	3.0132	4.2768	.09	5.81	
Glucose	D0	3	33.1433	1.70160	.98242	28.9163	37.3703	31.26	34.57
GYCC	D1	3	27.8500	.91110	.52602	25.5867	30.1133	27.09	28.86
	D2	3	27.9067	.33650	.19428	27.0708	28.7426	27.66	28.29
	D3	3	26.8733	1.25540	.72481	23.7547	29.9919	25.60	28.11
	D4	3	26.4367	1.13650	.65616	23.6134	29.2599	25.14	27.26
	D5	3	26.8767	1.50640	.86972	23.1346	30.6188	25.14	27.83
	D6	3	26.5333	1.21162	.69953	23.5235	29.5432	25.43	27.83
	D7	3	24.3800	3.42532	1.97761	15.8710	32.8890	20.74	27.54
Total	24	27.5000	2.78584	.56866	26.3236	28.6764	20.74	34.57	
pH	D0	3	5.9367	.01155	.00667	5.9080	5.9654	5.93	5.95
GYCC	D1	3	4.6167	.02517	.01453	4.5542	4.6792	4.59	4.64
	D2	3	4.5767	.04041	.02333	4.4763	4.6771	4.53	4.60
	D3	3	4.5767	.03512	.02028	4.4894	4.6639	4.54	4.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-5 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร GYCC ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
D4	3	4.5700	.04359	.02517	4.4617	4.6783	4.52	4.60	
D5	3	4.5867	.00577	.00333	4.5723	4.6010	4.58	4.59	
D6	3	4.5867	.02082	.01202	4.5350	4.6384	4.57	4.61	
D7	3	4.5900	.04583	.02646	4.4762	4.7038	4.54	4.63	
Total	24	4.7550	.45720	.09333	4.5619	4.9481	4.52	5.95	

ตารางที่ จ-6 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร GYCC ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone GYCC			
Duncan ^a			
concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	3	.1167	
D1	3		2.7767
D3	3		2.8433
D2	3		2.8700
D4	3		3.1633
D6	3		3.5600
D7	3		3.5600
D5	3		3.5667
Sig.		1.000	.164

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ButanolGYCC

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.0000		
D1	3	.4500	.4500	
D5	3		.8567	.8567
D6	3		.8833	.8833
D7	3		.9833	.9833
D3	3			1.1000
D4	3			1.1867
D2	3			1.1967
Sig.		.111	.083	.272

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Ethanol GYCC

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
D0	3	.0000	
D1	3	.0000	
D2	3	.0000	
D3	3	.0000	
D5	3	.0000	
D6	3	.0000	
D7	3	.0000	
D4	3	.0400	
Sig.		.097	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE GYCC

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.1167		
D1	3		3.2300	
D3	3		3.9433	3.9433
D2	3		4.0600	4.0600
D4	3			4.3567
D6	3			4.4433
D5	3			4.4700
D7	3			4.5400
Sig.		1.000	.102	.258

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Glucose GYCC

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D7	3	24.3800		
D4	3	26.4367	26.4367	
D6	3	26.5333	26.5333	
D3	3	26.8733	26.8733	
D5	3	26.8767	26.8767	
D1	3		27.8500	
D2	3		27.9067	
D0	3			33.1433
Sig.		.116	.348	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH GYCC

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D4	3	4.5700	
D2	3	4.5767	
D3	3	4.5767	
D5	3	4.5867	
D6	3	4.5867	
D7	3	4.5900	
D1	3	4.6167	
D0	3		5.9367
Sig.		.131	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-7 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone P2	D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	D1	3	.3967	.19604	.11319	-.0903	.8837	.19	.58
	D2	3	.4567	.06506	.03756	.2950	.6183	.39	.52
	D3	3	.4567	.03786	.02186	.3626	.5507	.43	.50
	D4	3	.5933	.25736	.14859	-.0460	1.2326	.43	.89
	D5	3	.6067	.16743	.09667	.1907	1.0226	.51	.80
	D6	3	.6033	.08145	.04702	.4010	.8057	.51	.66
	D7	3	.5467	.03512	.02028	.4594	.6339	.51	.58
Total		24	.4575	.22275	.04547	.3634	.5516	.00	.89
Butanol P2	D0	3	.0767	.01155	.00667	.0480	.1054	.07	.09
	D1	3	1.2833	.23692	.13679	.6948	1.8719	1.01	1.43
	D2	3	1.8000	.27221	.15716	1.1238	2.4762	1.49	2.00
	D3	3	2.1033	.40204	.23212	1.1046	3.1020	1.68	2.48
	D4	3	2.6033	.67308	.38860	.9313	4.2754	2.19	3.38
	D5	3	2.8033	.92381	.53336	.5085	5.0982	2.26	3.87
	D6	3	2.6900	.65506	.37820	1.0627	4.3173	1.94	3.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-7 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium sp. G10*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	2.3367	.51433	.29695	1.0590	3.6143	1.75	2.71
Total	24	1.9621	.98105	.20026	1.5478	2.3763	.07	3.87
Ethanol P2								
D0	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D5	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D6	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
D7	3	.0133	.02309	.01333	-.0440	.0707	.00	.04
Total	24	.0017	.00816	.00167	-.0018	.0051	.00	.04
ABE P2								
D0	3	.0767	.01155	.00667	.0480	.1054	.07	.09
D1	3	1.6833	.42360	.24456	.6311	2.7356	1.20	1.99
D2	3	2.2567	.28746	.16597	1.5426	2.9708	1.95	2.52
D3	3	2.5600	.43035	.24846	1.4910	3.6290	2.12	2.98
D4	3	3.1967	.93039	.53716	.8854	5.5079	2.62	4.27
D5	3	3.4133	1.08832	.62834	-.7098	6.1169	2.78	4.67
D6	3	3.2967	.74002	.42725	1.4583	5.1350	2.45	3.82
D7	3	2.9033	.50123	.28939	1.6582	4.1485	2.34	3.30
Total	24	2.4233	1.19071	.24305	1.9205	2.9261	.07	4.67
Glucose P2								
D0	3	33.1433	3.28355	1.89576	24.9865	41.3001	30.11	36.63
D1	3	28.1333	.41102	.23730	27.1123	29.1544	27.66	28.40
D2	3	27.7900	.34176	.19732	26.9410	28.6390	27.43	28.11
D3	3	26.6300	.50685	.29263	25.3709	27.8891	26.06	27.03
D4	3	26.5333	.28676	.16556	25.8210	27.2457	26.23	26.80
D5	3	25.9600	.86481	.49930	23.8117	28.1083	25.03	26.74
D6	3	24.3033	.45611	.26333	23.1703	25.4364	23.83	24.74
D7	3	24.3600	.63095	.36428	22.7926	25.9274	23.71	24.97
Total	24	27.1067	2.88345	.58858	25.8891	28.3242	23.71	36.63
pH P2								
D0	3	6.1233	.08021	.04631	5.9241	6.3226	6.04	6.20
D1	3	4.6733	.07506	.04333	4.4869	4.8598	4.60	4.75
D2	3	4.7400	.08888	.05132	4.5192	4.9608	4.64	4.81
D3	3	4.7267	.04041	.02333	4.6263	4.8271	4.69	4.77
D4	3	4.6867	.01528	.00882	4.6487	4.7246	4.67	4.70
D5	3	4.6333	.04163	.02404	4.5299	4.7368	4.60	4.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ใช้เฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่หรือใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-7 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D6	3	4.5833	.02082	.01202	4.5316	4.6350	4.56	4.60
D7	3	4.6000	.05568	.03215	4.4617	4.7383	4.55	4.66
Total	24	4.8458	.49848	.10175	4.6353	5.0563	4.55	6.20

ตารางที่ จ-8 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D0	3	.0000	
D1	3		.3967
D3	3		.4567
D2	3		.4567
D7	3		.5467
D4	3		.5933
D6	3		.6033
D5	3		.6067
Sig.		1.000	.111

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Butanol P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.0767		
D1	3		1.2833	
D2	3		1.8000	1.8000
D3	3		2.1033	2.1033
D7	3			2.3367
D4	3			2.6033
D6	3			2.6900
D5	3			2.8033
Sig.		1.000	.093	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ethanol P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D0	3	.0000
D1	3	.0000
D2	3	.0000
D3	3	.0000
D4	3	.0000
D5	3	.0000
D6	3	.0000
D7	3	.0133
Sig.		.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.0767		
D1	3		1.6833	
D2	3		2.2567	2.2567
D3	3		2.5600	2.5600
D7	3			2.9033
D4	3			3.1967
D6	3			3.2967
D5	3			3.4133
Sig.		1.000	.132	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Glucose P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D6	3	24.3033		
D7	3	24.3600		
D5	3	25.9600	25.9600	
D4	3	26.5333	26.5333	
D3	3	26.6300	26.6300	
D2	3		27.7900	
D1	3		28.1333	
D0	3			33.1433
Sig.		.057	.074	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH P2

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D6	3	4.5833		
D7	3	4.6000		
D5	3	4.6333	4.6333	
D1	3	4.6733	4.6733	
D4	3	4.6867	4.6867	
D3	3		4.7267	
D2	3		4.7400	
D0	3			6.1233
Sig.		.066	.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ จ-9 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร RCM T6 GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Butanol	RCM	3	2.1708	2.50541	1.44650	-4.0530	8.3946	.28	5.01
	T6	3	13.4890	2.48919	1.43714	7.3055	19.6725	10.69	15.44
	GYCC	3	1.1967	.25166	.14530	.5715	1.8218	.93	1.43
	P2	3	2.6033	.67308	.38860	.9313	4.2754	2.19	3.38
	Total	12	4.8649	5.44885	1.57295	1.4029	8.3270	.28	15.44
Yield	RCM	3	.1591	.19806	.11435	-.3329	.6511	.01	.38
	T6	3	.5492	.05049	.02915	.4237	.6746	.49	.58
	GYCC	3	.2567	.13204	.07623	-.0713	.5847	.14	.40
	P2	3	.4367	.18771	.10837	-.0296	.9030	.22	.55
	Total	12	.3504	.20580	.05941	.2196	.4812	.01	.58
Productivity	RCM	3	.0117	.01485	.00857	-.0252	.0486	.00	.03
	T6	3	.0797	.01477	.00853	.0430	.1164	.06	.09
	GYCC	3	.0267	.00577	.00333	.0123	.0410	.02	.03
	P2	3	.0227	.00775	.00447	.0035	.0420	.02	.03
	Total	12	.0352	.02914	.00841	.0167	.0537	.00	.09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-10 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก(productivity) ในอาหาร RCM T6 GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Butanol

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
GYCC	3	1.1967	
RCM	3	2.1708	
P2	3	2.6033	
T6	3		13.4890
Sig.		.386	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol Yield

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
RCM	3	.1591	
GYCC	3	.2567	.2567
P2	3	.4367	.4367
T6	3		.5492
Sig.		.067	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol Productivity

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
RCM	3	.0117	
P2	3	.0227	
GYCC	3	.0267	
T6	3		.0797
Sig.		.165	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.,

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-11 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร RCM T6 GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
ABE	RCM	3	7.8936	1.52087	.87808	4.1156	11.6717	6.71	9.61
	T6	3	16.2097	3.25390	1.87864	8.1266	24.2929	12.51	18.62
	GYCC	3	4.0600	.10440	.06028	3.8006	4.3194	3.99	4.18
	P2	3	3.1967	.93039	.53716	.8854	5.5079	2.62	4.27
	Total	12	7.8400	5.60250	1.61730	4.2804	11.3997	2.62	18.62
ABE Yield	RCM	3	.2333	.09153	.05284	.0059	.4607	.14	.32
	T6	3	.6294	.10108	.05836	.3783	.8805	.51	.70
	GYCC	3	.8033	.24786	.14310	.1876	1.4190	.58	1.07
	P2	3	.5395	.24364	.14066	-.0658	1.1447	.26	.69
	Total	12	.5514	.26822	.07743	.3809	.7218	.14	1.07
ABE Productivity	RCM	3	.0155	.00742	.00428	-.0029	.0339	.01	.02
	T6	3	.0908	.01811	.01046	.0458	.1358	.07	.11
	GYCC	3	.0800	.00000	.00000	.0800	.0800	.08	.08
	P2	3	.0328	.00482	.00278	.0208	.0448	.03	.04
	Total	12	.0548	.03397	.00981	.0332	.0764	.01	.11

ตารางที่ จ-12 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร RCM T6 GYCC และ P2 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Subset for alpha = 0.05		
concentration	N	1	2	3
P2	3	3.1967		
GYCC	3	4.0600		
RCM	3		7.8936	
T6	3			16.2097
Sig.		.584	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE Yield

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
RCM	3	.2333	
P2	3	.5395	.5395
T6	3		.6294
GYCC	3		.8033
Sig.		.079	.135

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE Productivity

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
RCM	3	.0155	
P2	3	.0328	
GYCC	3		.0800
T6	3		.0908
Sig.		.069	.226

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

ตารางที่ จ-13 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone pH 5.0	D0	3	.1163	.11842	.06837	-.1778	.4105	.04	.25
	D1	3	.6160	.11506	.06643	.3302	.9018	.49	.72
	D2	3	1.5750	.35618	.20564	.6902	2.4598	1.25	1.96
	D3	3	1.8783	.17293	.09984	1.4487	2.3079	1.78	2.08
	D4	3	2.4423	.27704	.15995	1.7541	3.1305	2.14	2.68
	D5	3	2.0827	.21201	.12241	1.5560	2.6093	1.84	2.23
	D6	3	1.9083	.10601	.06120	1.6450	2.1717	1.79	1.98
	D7	3	2.4687	.52583	.30359	1.1624	3.7749	2.01	3.04
	Total	24	1.6360	.84120	.17171	1.2808	1.9912	.04	3.04
Butanol pH 5.0	D0	3	.1597	.05558	.03209	.0216	.2977	.12	.22
	D1	3	3.2870	.35228	.20339	2.4119	4.1621	2.90	3.59
	D2	3	7.6570	.15501	.08949	7.2719	8.0421	7.50	7.81
	D3	3	9.0233	1.00541	.58047	6.5258	11.5209	8.37	10.18
	D4	3	9.6593	1.40084	.80878	6.1795	13.1392	8.69	11.27
	D5	3	9.5047	1.80125	1.03995	5.0301	13.9792	8.32	11.58
	D6	3	10.3800	1.98875	1.14820	5.4397	15.3203	9.14	12.67
	D7	3	11.5153	1.76980	1.02179	7.1189	15.9118	10.26	13.54
	Total	24	7.6483	3.88758	.79355	6.0067	9.2899	.12	13.54
Ethanol pH 5.0	D0	3	.1757	.00681	.00393	.1588	.1926	.17	.18
	D1	3	.2100	.03020	.01744	.1350	.2850	.18	.24
	D2	3	.0927	.02194	.01267	.0382	.1472	.07	.11
	D3	3	.0973	.03225	.01862	.0172	.1775	.06	.13
	D4	3	.2127	.11956	.06903	-.0843	.5097	.09	.32
	D5	3	.1517	.04508	.02603	.0397	.2637	.10	.19
	D6	3	.1510	.06173	.03564	-.0024	.3044	.11	.22
	D7	3	.2033	.01943	.01122	.1551	.2516	.18	.22
	Total	24	.1618	.06391	.01305	.1348	.1888	.06	.32
ABE pH 5.0	D0	3	.4517	.17810	.10283	.0092	.8941	.34	.66
	D1	3	4.1127	.47607	.27486	2.9300	5.2953	3.57	4.46
	D2	3	9.3250	.34140	.19711	8.4769	10.1731	9.09	9.72
	D3	3	10.9993	.91864	.53037	8.7173	13.2814	10.43	12.06
	D4	3	12.3143	1.14521	.66119	9.4695	15.1592	11.62	13.64
	D5	3	11.7393	1.95343	1.12781	6.8867	16.5919	10.35	13.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตให้พิมพ์หรือเผยแพร่เป็นการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-13 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D6	3	12.4390	2.02862	1.17123	7.3996	17.4784	11.05	14.77
D7	3	14.1870	2.29833	1.32694	8.4776	19.8964	12.47	16.80
Total	24	9.4460	4.66981	.95322	7.4742	11.4179	.34	16.80
Glucose								
D0	3	32.1833	.59028	.34080	30.7170	33.6497	31.54	32.70
D1	3	27.1733	1.43549	.82878	23.6074	30.7393	25.76	28.63
D2	3	14.0433	.28937	.16707	13.3245	14.7622	13.71	14.23
D3	3	14.7300	1.80300	1.04096	10.2511	19.2089	12.99	16.59
D4	3	13.4000	1.15892	.66910	10.5211	16.2789	12.30	14.61
D5	3	12.3567	.38812	.22408	11.3925	13.3208	12.00	12.77
D6	3	12.2567	.59786	.34517	10.7715	13.7418	11.83	12.94
D7	3	12.1733	1.97571	1.14068	7.2654	17.0813	10.29	14.23
Total	24	17.2896	7.53458	1.53799	14.1080	20.4712	10.29	32.70
pH 5.0								
D0	3	5.2200	.01000	.00577	5.1952	5.2448	5.21	5.23
D1	3	5.4033	.05508	.03180	5.2665	5.5401	5.35	5.46
D2	3	6.4533	.71276	.41151	4.6827	8.2239	5.65	7.01
D3	3	5.2433	.76540	.44190	3.3420	7.1447	4.66	6.11
D4	3	5.0600	.80728	.46608	3.0546	7.0654	4.54	5.99
D5	3	4.9000	.56471	.32604	3.4972	6.3028	4.53	5.55
D6	3	4.8333	.44881	.25912	3.7184	5.9482	4.54	5.35
D7	3	4.8400	.45310	.26160	3.7144	5.9656	4.53	5.36
Total	24	5.2442	.68734	.14030	4.9539	5.5344	4.53	7.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-14 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.1163			
D1	3		.6160		
D2	3			1.5750	
D3	3			1.8783	
D6	3			1.9083	
D5	3			2.0827	2.0827
D4	3				2.4423
D7	3				2.4687
Sig.		1.000	1.000	.050	.118

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Buthanol pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.1597				
D1	3		3.2870			
D2	3			7.6570		
D3	3			9.0233	9.0233	
D5	3			9.5047	9.5047	9.5047
D4	3			9.6593	9.6593	9.6593
D6	3				10.3800	10.3800
D7	3					11.5153
Sig.		1.000	1.000	.100	.255	.098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D2	3	.0927	
D3	3	.0973	
D6	3	.1510	.1510
D5	3	.1517	.1517
D0	3	.1757	.1757
D7	3		.2033
D1	3		.2100
D4	3		.2127
Sig.		.105	.226

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.4517				
D1	3		4.1127			
D2	3			9.3250		
D3	3			10.9993	10.9993	
D5	3			11.7393	11.7393	11.7393
D4	3				12.3143	12.3143
D6	3				12.4390	12.4390
D7	3					14.1870
Sig.		1.000	1.000	.062	.264	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D7	3	12.1733			
D6	3	12.2567			
D5	3	12.3567			
D4	3	13.4000	13.4000		
D2	3	14.0433	14.0433		
D3	3		14.7300		
D1	3			27.1733	
D0	3				32.1833
Sig.		.103	.216	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 5.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D6	3	4.8333	
D7	3	4.8400	
D5	3	4.9000	
D4	3	5.0600	
D0	3	5.2200	
D3	3	5.2433	
D1	3	5.4033	
D2	3		6.4533
Sig.		.281	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-15 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร ที่ pH เริ่มต้น 5.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone pH 5.5	D0	3	.1693	.16518	.09537	-.2410	.5797	.05	.36
	D1	3	.9180	.14816	.08554	.5499	1.2861	.77	1.06
	D2	3	2.1443	.33735	.19477	1.3063	2.9824	1.89	2.53
	D3	3	1.9770	.25034	.14453	1.3551	2.5989	1.78	2.26
	D4	3	1.9120	.23625	.13640	1.3251	2.4989	1.76	2.18
	D5	3	2.0317	.23229	.13411	1.4546	2.6087	1.84	2.29
	D6	3	2.3213	.30467	.17590	1.5645	3.0782	2.11	2.67
	D7	3	1.9973	.21975	.12687	1.4514	2.5432	1.76	2.19
Total	24	1.6839	.73783	.15061	-.13723	1.9954	.05	2.67	
Butanol pH 5.5	D0	3	.8760	.90272	.52118	-1.3665	3.1185	.16	1.89
	D1	3	5.3090	.47301	.27310	4.1340	6.4840	4.79	5.72
	D2	3	8.7933	1.16697	.67375	5.8944	11.6922	7.91	10.12
	D3	3	9.8410	.41353	.23875	8.8137	10.8683	9.55	10.32
	D4	3	10.0140	.60469	.34912	8.5119	11.5161	9.50	10.68
	D5	3	10.2820	.60389	.34866	8.7819	11.7821	9.69	10.90
	D6	3	11.1607	.59193	.34175	9.6902	12.6311	10.50	11.63
	D7	3	11.8917	.87158	.50321	9.7265	14.0568	10.94	12.66
Total	24	8.5210	3.56029	.72674	7.0176	10.0243	.16	12.66	
Ethanol pH 5.5	D0	3	.0603	.10450	.06033	-.1993	.3199	.00	.18
	D1	3	.1167	.10614	.06128	-.1470	.3803	.04	.24
	D2	3	.1170	.03897	.02250	.0202	.2138	.08	.16
	D3	3	.1173	.04823	.02785	-.0025	.2371	.07	.16
	D4	3	.0827	.01762	.01017	-.0389	.1264	.06	.10
	D5	3	.1063	.07246	.04183	-.0737	.2863	.06	.19
	D6	3	.1663	.05408	.03122	.0320	.3007	.11	.22
	D7	3	.1300	.05151	.02974	.0020	.2580	.08	.18
Total	24	.1121	.06430	.01312	.0849	.1392	.00	.24	
ABE pH 5.5	D0	3	1.1057	1.16989	.67543	-1.8005	4.0118	.21	2.43
	D1	3	6.3437	.71268	.41147	4.5733	8.1141	5.60	7.02
	D2	3	11.0547	1.51897	.87698	7.2813	14.8280	10.04	12.80
	D3	3	11.9353	.69131	.39913	10.2180	13.6526	11.51	12.73
	D4	3	12.0087	.84829	.48976	9.9014	14.1159	11.35	12.97
	D5	3	12.4197	.77420	.44699	10.4964	14.3429	11.72	13.25
	D6	3	13.6480	.76320	.44064	11.7521	15.5439	12.79	14.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-15 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	14.0187	1.06424	.61444	11.3750	16.6624	12.83	14.88
Total	24	10.3168	4.28867	.87542	8.5058	12.1277	.21	14.88
Glucose								
pH 5.5								
D0	3	29.8000	.75186	.43409	27.9323	31.6677	29.19	30.64
D1	3	20.6600	2.31968	1.33927	14.8976	26.4224	18.43	23.06
D2	3	14.0433	2.88786	1.66731	6.8695	21.2172	11.83	17.31
D3	3	13.3833	1.02442	.59145	10.8385	15.9281	12.21	14.10
D4	3	14.5133	1.04854	.60537	11.9086	17.1180	13.37	15.43
D5	3	12.5433	1.24388	.71815	9.4534	15.6333	11.36	13.84
D6	3	12.7000	3.42510	1.97748	4.1916	21.2084	9.26	16.11
D7	3	11.8700	1.04000	.60044	9.2865	14.4535	10.67	12.51
Total	24	16.1892	6.09897	1.24495	13.6138	18.7645	9.26	30.64
pH 5.5								
D0	3	5.4600	.01000	.00577	5.4352	5.4848	5.45	5.47
D1	3	6.1367	.10116	.05840	5.8854	6.3880	6.02	6.20
D2	3	6.9800	.07550	.04359	6.7925	7.1675	6.91	7.06
D3	3	6.9467	.29092	.16796	6.2240	7.6693	6.67	7.25
D4	3	6.2733	.73009	.42152	4.4597	8.0870	5.55	7.01
D5	3	5.2833	.42158	.24340	4.2361	6.3306	5.03	5.77
D6	3	4.9033	.08386	.04842	4.6950	5.1117	4.85	5.00
D7	3	4.8233	.06807	.03930	4.6542	4.9924	4.77	4.90
Total	24	5.8508	.86324	.17621	5.4863	6.2153	4.77	7.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-16 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.1693		
D1	3		.9180	
D4	3			1.9120
D3	3			1.9770
D7	3			1.9973
D5	3			2.0317
D2	3			2.1443
D6	3			2.3213
Sig.		1.000	1.000	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.8760				
D1	3		5.3090			
D2	3			8.7933		
D3	3			9.8410	9.8410	
D4	3			10.0140	10.0140	
D5	3				10.2820	
D6	3				11.1607	11.1607
D7	3					11.8917
Sig.		1.000	1.000	.073	.061	.246

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
D0	3	.0603	
D4	3	.0827	
D5	3	.1063	
D1	3	.1167	
D2	3	.1170	
D3	3	.1173	
D7	3	.1300	
D6	3	.1663	
Sig.		.113	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	1.1057				
D1	3		6.3437			
D2	3			11.0547		
D3	3			11.9353	11.9353	
D4	3			12.0087	12.0087	
D5	3			12.4197	12.4197	12.4197
D6	3				13.6480	13.6480
D7	3					14.0187
Sig.		1.000	1.000	.135	.065	.075

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D7	3	11.8700		
D5	3	12.5433		
D6	3	12.7000		
D3	3	13.3833		
D2	3	14.0433		
D4	3	14.5133		
D1	3		20.6600	
D0	3			29.8000
Sig.		.159	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 5.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D7	3	4.8233			
D6	3	4.9033	4.9033		
D5	3	5.2833	5.2833		
D0	3		5.4600		
D1	3			6.1367	
D4	3			6.2733	
D3	3				6.9467
D2	3				6.9800
Sig.		.114	.060	.609	.900

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-17 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone pH 6.0	D0	3	.2143	.03879	.02239	.1180	.3107	.17	.24
	D1	3	2.8107	.15217	.08786	2.4327	3.1887	2.71	2.99
	D2	3	1.1580	.16857	.09733	.7392	1.5768	1.01	1.34
	D3	3	1.6233	.02050	.01184	1.5724	1.6743	1.60	1.64
	D4	3	2.1120	.10966	.06331	1.8396	2.3844	1.99	2.21
	D5	3	1.9390	.05012	.02894	1.8145	2.0635	1.89	1.99
	D6	3	1.8553	.03194	.01844	1.7760	1.9347	1.82	1.88
	D7	3	2.5060	.07275	.04200	2.3253	2.6867	2.43	2.58
Total	24	1.7773	.77819	.15885	1.4487	2.1059	.17	2.99	
Butanol pH 6.0	D0	3	.1367	.01102	.00636	.1093	.1640	.13	.15
	D1	3	4.4560	.26516	.15309	3.7973	5.1147	4.29	4.76
	D2	3	8.1373	1.07811	.62245	5.4592	10.8155	6.94	9.03
	D3	3	9.9117	.18890	.10906	9.4424	10.3809	9.70	10.07
	D4	3	10.5920	.52057	.30055	9.2988	11.8852	10.04	11.07
	D5	3	10.3347	.44226	.25534	9.2360	11.4333	9.82	10.59
	D6	3	11.0977	.27524	.15891	10.4139	11.7814	10.84	11.39
	D7	3	12.0360	.65769	.37972	10.4022	13.6698	11.30	12.57
Total	24	8.3378	3.90154	.79640	6.6903	9.9852	.13	12.57	
Ethanol pH 6.0	D0	3	.1647	.00945	.00546	.1412	.1881	.15	.17
	D1	3	.2063	.03907	.02256	.1093	.3034	.17	.24
	D2	3	.0910	.00361	.00208	.0820	.1000	.09	.09
	D3	3	.1760	.03081	.01779	.0995	.2525	.15	.21
	D4	3	.2367	.03118	.01800	.1592	.3141	.21	.27
	D5	3	.1187	.04128	.02384	.0161	.2212	.07	.14
	D6	3	.0960	.01908	.01102	.0486	.1434	.08	.12
	D7	3	.2837	.04669	.02696	.1677	.3997	.23	.32
Total	24	.1716	.07066	.01442	.1418	.2015	.07	.32	
ABE pH 6.0	D0	3	.5153	.03765	.02174	.4218	.6089	.47	.54
	D1	3	7.4730	.27214	.15712	6.7970	8.1490	7.17	7.70
	D2	3	9.3863	1.23708	.71423	6.3132	12.4594	8.04	10.46
	D3	3	11.7113	.15451	.08920	11.3275	12.0951	11.56	11.87
	D4	3	12.9407	.65856	.38022	11.3047	14.5766	12.24	13.55
	D5	3	12.3920	.37986	.21931	11.4484	13.3356	11.96	12.66
D6	3	13.0490	.28276	.16325	12.3466	13.7514	12.78	13.34	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-17 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	14.8257	.75841	.43787	12.9417	16.7097	13.96	15.38
Total	24	10.2867	4.39150	.89641	8.4323	12.1410	.47	15.38
Glucose								
pH 6.0								
D0	3	29.5267	.99067	.57197	27.0657	31.9876	28.41	30.30
D1	3	19.2600	1.04446	.60302	16.6654	21.8546	18.13	20.19
D2	3	11.6300	1.42155	.82073	8.0987	15.1613	9.99	12.51
D3	3	12.1533	.38812	.22408	11.1892	13.1175	11.74	12.51
D4	3	9.6267	.75222	.43429	7.7581	11.4953	8.91	10.41
D5	3	8.3567	.78501	.45322	6.4066	10.3067	7.84	9.26
D6	3	7.9167	.26102	.15070	7.2682	8.5651	7.67	8.19
D7	3	8.5300	.15395	.08888	8.1476	8.9124	8.36	8.66
Total	24	13.3750	7.18900	1.46745	10.3394	16.4106	7.67	30.30
pH 6.0								
D0	3	5.9167	.06658	.03844	5.7513	6.0821	5.86	5.99
D1	3	5.8233	.24846	.14345	5.2061	6.4405	5.67	6.11
D2	3	7.1167	.04726	.02728	6.9993	7.2341	7.08	7.17
D3	3	6.8333	.16258	.09387	6.4295	7.2372	6.69	7.01
D4	3	6.0500	.67557	.39004	4.3718	7.7282	5.33	6.67
D5	3	5.0100	.18330	.10583	4.5547	5.4653	4.85	5.21
D6	3	4.8800	.13077	.07550	4.5552	5.2048	4.79	5.03
D7	3	4.8500	.09539	.05508	4.6130	5.0870	4.79	4.96
Total	24	5.8100	.85904	.17535	5.4473	6.1727	4.79	7.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-18 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.0 ด้วยเชื้อ *Clostridium sp.* G10

Acetone pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
D0	3	.2143						
D2	3		1.1580					
D3	3			1.6233				
D6	3				1.8553			
D5	3				1.9390			
D4	3					2.1120		
D7	3						2.5060	
D1	3							2.8107
Sig.		1.000	1.000	1.000	.304	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.1367					
D1	3		4.4560				
D2	3			8.1373			
D3	3				9.9117		
D5	3				10.3347	10.3347	
D4	3				10.5920	10.5920	
D6	3					11.0977	
D7	3						12.0360
Sig.		1.000	1.000	1.000	.155	.113	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D2	3	.0910				
D6	3	.0960				
D5	3	.1187	.1187			
D0	3		.1647	.1647		
D3	3			.1760		
D1	3			.2063	.2063	
D4	3				.2367	.2367
D7	3					.2837
Sig.		.319	.090	.140	.251	.084

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.5153					
D1	3		7.4730				
D2	3			9.3863			
D3	3				11.7113		
D5	3				12.3920	12.3920	
D4	3					12.9407	
D6	3					13.0490	
D7	3						14.8257
Sig.		1.000	1.000	1.000	.183	.220	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D6	3	7.9167				
D5	3	8.3567	8.3567			
D7	3	8.5300	8.5300			
D4	3		9.6267			
D2	3			11.6300		
D3	3			12.1533		
D1	3				19.2600	
D0	3					29.5267
Sig.		.404	.094	.451	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 6.0

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D7	3	4.8500		
D6	3	4.8800		
D5	3	5.0100		
D1	3		5.8233	
D0	3		5.9167	
D4	3		6.0500	
D3	3			6.8333
D2	3			7.1167
Sig.		.512	.356	.227

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-19 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone pH 6.5	D0	3	.2410	.01300	.00751	.2087	.2733	.23	.25
	D1	3	1.1307	.75482	.43579	-.7444	3.0057	.66	2.00
	D2	3	1.1857	.17677	.10206	.7466	1.6248	.98	1.31
	D3	3	1.4897	.27234	.15724	.8131	2.1662	1.18	1.67
	D4	3	1.9700	.59764	.34505	.4854	3.4546	1.29	2.40
	D5	3	2.0700	.77748	.44888	.1386	4.0014	1.19	2.66
	D6	3	2.0993	.60395	.34869	.5990	3.5996	1.41	2.51
	D7	3	2.5413	.54587	.31516	1.1853	3.8973	1.92	2.93
Total	24	1.5910	.82962	.16935	1.2406	1.9413	.23	2.93	
Butanol pH 6.5	D0	3	.1000	.00500	.00289	.0876	.1124	.10	.11
	D1	3	4.5383	.82376	.47560	2.4920	6.5847	3.65	5.28
	D2	3	8.1420	.86127	.49725	6.0025	10.2815	7.17	8.80
	D3	3	9.2447	1.35978	.78507	5.8668	12.6225	7.68	10.13
	D4	3	9.9100	1.45817	.84187	6.2877	13.5323	8.29	11.11
	D5	3	9.9387	1.63290	.94276	5.8823	13.9950	8.06	11.01
	D6	3	10.2797	1.32079	.76256	6.9986	13.5607	8.76	11.07
	D7	3	10.8073	.93234	.53828	8.4913	13.1234	9.73	11.37
Total	24	7.8701	3.67298	.74974	6.3191	9.4210	.10	11.37	
Ethanol pH 6.5	D0	3	.1580	.01212	.00700	.1279	.1881	.15	.17
	D1	3	.2007	.02570	.01484	.1368	.2645	.17	.22
	D2	3	.0957	.00833	.00481	.0750	.1164	.09	.11
	D3	3	.1090	.00436	.00252	.0982	.1198	.10	.11
	D4	3	.1213	.03911	.02258	.0242	.2185	.08	.16
	D5	3	.1870	.04770	.02754	.0685	.3055	.14	.24
	D6	3	.2157	.06728	.03884	.0485	.3828	.17	.29
	D7	3	.2253	.09771	.05641	-.0174	.4680	.12	.31
Total	24	.1641	.06294	.01285	.1375	.1907	.08	.31	
ABE pH 6.5	D0	3	.4997	.02702	.01560	.4325	.5668	.47	.52
	D1	3	5.8693	.35651	.20583	4.9837	6.7549	5.51	6.23
	D2	3	9.4233	1.02996	.59465	6.8648	11.9819	8.26	10.20
	D3	3	10.8433	1.62690	.93929	6.8019	14.8848	8.97	11.86
	D4	3	12.0013	2.02234	1.16760	6.9776	17.0251	9.74	13.62
	D5	3	12.1957	2.44891	1.41388	6.1122	18.2791	9.39	13.90
D6	3	12.5940	1.94366	1.12217	7.7657	17.4223	10.35	13.75	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-19 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium sp. G10*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	13.5743	1.56558	.90389	9.6852	17.4634	11.77	14.57
Total	24	9.6251	4.40854	.89989	7.7636	11.4867	.47	14.57
Glu6.5								
D0	3	28.3467	1.46070	.84333	24.7181	31.9752	26.66	29.19
D1	3	17.9567	.33292	.19221	17.1297	18.7837	17.74	18.34
D2	3	14.7000	2.00980	1.16036	9.7074	19.6926	12.94	16.89
D3	3	12.9033	3.69535	2.13351	3.7236	22.0831	9.99	17.06
D4	3	13.3867	1.88431	1.08791	8.7058	18.0676	12.21	15.56
D5	3	12.8400	1.63918	.94638	8.7681	16.9119	11.31	14.57
D6	3	11.5733	1.50188	.86711	7.8425	15.3042	10.03	13.03
D7	3	12.6300	1.43628	.82924	9.0621	16.1979	11.23	14.10
Total	24	15.5421	5.52427	1.12764	13.2094	17.8748	9.99	29.19
pH6.5								
D0	3	6.2133	.03215	.01856	6.1335	6.2932	6.19	6.25
D1	3	6.3433	.11372	.06566	6.0608	6.6258	6.25	6.47
D2	3	6.8733	.24685	.14252	6.2601	7.4865	6.60	7.08
D3	3	6.1033	.80513	.46484	4.1033	8.1034	5.29	6.90
D4	3	5.6333	1.18509	.68421	2.6894	8.5773	4.80	6.99
D5	3	5.5300	1.22650	.70812	2.4832	8.5768	4.71	6.94
D6	3	5.0067	.36774	.21232	4.0931	5.9202	4.69	5.41
D7	3	4.8533	.12423	.07172	4.5447	5.1619	4.71	4.93
Total	24	5.8196	.87389	.17838	5.4506	6.1886	4.69	7.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-20 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium sp.* G10

Acetone pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.2410		
D1	3	1.1307	1.1307	
D2	3	1.1857	1.1857	
D3	3		1.4897	
D4	3		1.9700	1.9700
D5	3		2.0700	2.0700
D6	3		2.0993	2.0993
D7	3			2.5413
Sig.		.056	.065	.247

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.1000			
D1	3		4.5383		
D2	3			8.1420	
D3	3			9.2447	9.2447
D4	3			9.9100	9.9100
D5	3			9.9387	9.9387
D6	3			10.2797	10.2797
D7	3				10.8073
Sig.		1.000	1.000	.056	.153

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D2	3	.0957		
D3	3	.1090	.1090	
D4	3	.1213	.1213	
D0	3	.1580	.1580	.1580
D5	3	.1870	.1870	.1870
D1	3		.2007	.2007
D6	3			.2157
D7	3			.2253
Sig.		.052	.051	.143

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.4997			
D1	3		5.8693		
D2	3			9.4233	
D3	3			10.8433	10.8433
D4	3			12.0013	12.0013
D5	3			12.1957	12.1957
D6	3				12.5940
D7	3				13.5743
Sig.		1.000	1.000	.065	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D6	3	11.5733		
D7	3	12.6300		
D5	3	12.8400		
D3	3	12.9033		
D4	3	13.3867		
D2	3	14.7000	14.7000	
D1	3		17.9567	
D0	3			28.3467
Sig.		.098	.058	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 6.5

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D7	3	4.8533			
D6	3	5.0067	5.0067		
D5	3	5.5300	5.5300	5.5300	
D4	3	5.6333	5.6333	5.6333	5.6333
D3	3	6.1033	6.1033	6.1033	6.1033
D0	3		6.2133	6.2133	6.2133
D1	3			6.3433	6.3433
D2	3				6.8733
Sig.		.060	.069	.208	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-21 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Butanol	5.0	3	11.5153	1.76980	1.02179	7.1189	15.9118	10.26	13.54
	5.5	3	11.2250	1.31390	.75858	7.9611	14.4889	10.08	12.66
	6.0	3	12.0360	.65769	.37972	10.4022	13.6698	11.30	12.57
	6.5	3	10.8073	.93234	.53828	8.4913	13.1234	9.73	11.37
Total	12	11.3959	1.15678	.33393		10.6609	12.1309	9.73	13.54
Butanol Yield	5.0	3	.5680	.05237	.03024	.4379	.6981	.51	.61
	5.5	3	.5833	.09315	.05378	.3519	.8147	.48	.64
	6.0	3	.5683	.05577	.03220	.4298	.7069	.52	.63
	6.5	3	.6810	.04629	.02673	.5660	.7960	.64	.73
Total	12	.6002	.07382	.02131		.5533	.6471	.48	.73
Butanol Productivity	5.0	3	.0677	.01079	.00623	.0409	.0945	.06	.08
	5.5	3	.0617	.00404	.00233	.0516	.0717	.06	.06
	6.0	3	.0710	.00361	.00208	.0620	.0800	.07	.07
	6.5	3	.0637	.00577	.00333	.0493	.0780	.06	.07
Total	12	.0660	.00684	.00197		.0617	.0703	.06	.08

ตารางที่ จ-22 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Butanol concentration

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6.5	3	10.8073
5.5	3	11.2250
5.0	3	11.5153
6.0	3	12.0360
Sig.		.286

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Butanol Yield

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5.0	3	.5680
6.0	3	.5683
5.5	3	.5833
6.5	3	.6810
Sig.		.079

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol Productivity

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5.5	3	.0617
6.5	3	.0637
5.0	3	.0677
6.0	3	.0710
Sig.		.147

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-23 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) อาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
ABE	5.0	3	14.1870	2.29833	1.32694	8.4776	19.8964	12.47	16.80
	5.5	3	14.0187	1.06424	.61444	11.3750	16.6624	12.83	14.88
	6.0	3	14.8257	.75841	.43787	12.9417	16.7097	13.96	15.38
	6.5	3	13.5743	1.56558	.90389	9.6852	17.4634	11.77	14.57
	Total	12	14.1514	1.39159	.40172	13.2672	15.0356	11.77	16.80
ABE Yield	5.0	3	.6860	.06972	.04025	.5128	.8592	.61	.75
	5.5	3	.7223	.03513	.02028	.6351	.8096	.68	.75
	6.0	3	.6833	.06401	.03696	.5243	.8423	.62	.75
	6.5	3	.8310	.07790	.04498	.6375	1.0245	.75	.90
	Total	12	.7307	.08292	.02394	.6780	.7834	.61	.90
ABE Productivity	5.0	3	.0817	.01422	.00821	.0463	.1170	.07	.10
	5.5	3	.0767	.00379	.00219	.0673	.0861	.07	.08
	6.0	3	.0850	.00436	.00252	.0742	.0958	.08	.09
	6.5	3	.0770	.00889	.00513	.0549	.0991	.07	.08
	Total	12	.0801	.00838	.00242	.0748	.0854	.07	.10

ตารางที่ จ-24 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ pH เริ่มต้น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

ABE		
Duncan ^a		
concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6.5	3	13.5743
5.5	3	14.0187
5.0	3	14.1870
6.0	3	14.8257
Sig.		.374

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABE Yield

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
6.0	3	.6833	
5.0	3	.6860	
5.5	3	.7223	.7223
6.5	3		.8310
Sig.		.493	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE Productivity

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5.5	3	.0767	
6.5	3	.0770	
5.0	3	.0817	
6.0	3	.0850	
Sig.		.310	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล

ตารางที่ จ-25 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Acetone 30	D0	3	.3173	.07315	.04223	.1356	.4990	.26	.40
	D1	3	1.3050	.25990	.15005	.6594	1.9506	1.01	1.46
	D2	3	.7887	.01626	.00939	.7483	.8291	.77	.80
	D3	3	2.0273	.00924	.00533	2.0044	2.0503	2.02	2.04
	D4	3	2.5260	.07104	.04102	2.3495	2.7025	2.48	2.61
	D5	3	1.4330	.06899	.03983	1.2616	1.6044	1.38	1.51
	D6	3	1.5463	.00551	.00318	1.5327	1.5600	1.54	1.55
	D7	3	1.7640	.09297	.05367	1.5331	1.9949	1.66	1.83
Total	24	1.4635	.66597	.13594	1.1822	1.7447	.26	2.61	
Butanol 30	D0	3	1.0557	.20428	.11794	.5482	1.5631	.92	1.29
	D1	3	5.6277	.40309	.23272	4.6263	6.6290	5.39	6.09
	D2	3	5.7983	.02857	.01650	5.7274	5.8693	5.77	5.83
	D3	3	10.9703	.03500	.02021	10.8834	11.0573	10.94	11.01
	D4	3	10.3667	.04682	.02703	10.2504	10.4830	10.32	10.41
	D5	3	9.2590	.03460	.01997	9.1731	9.3449	9.23	9.30
	D6	3	10.1297	.03256	.01880	10.0488	10.2106	10.10	10.16
	D7	3	9.8783	.02970	.01715	9.8045	9.9521	9.85	9.90
Total	24	7.8857	3.28650	.67085	6.4979	9.2735	.92	11.01	
Ethanol 30	D0	3	.0690	.06126	.03537	-.0832	.2212	.00	.12
	D1	3	.0620	.00819	.00473	.0417	.0823	.05	.07
	D2	3	.0550	.00520	.00300	.0421	.0679	.05	.06
	D3	3	.1020	.00173	.00100	.0977	.1063	.10	.10
	D4	3	.1027	.03931	.02270	.0050	.2003	.08	.15
	D5	3	.0863	.04648	.02683	-.0291	.2018	.06	.14
	D6	3	.0807	.00981	.00567	.0563	.1050	.08	.09
	D7	3	.1517	.04143	.02392	.0488	.2546	.10	.18
Total	24	.0887	.04100	.00837	.0714	.1060	.00	.18	
ABE 30	D0	3	1.4417	.22017	.12711	.8947	1.9886	1.27	1.69
	D1	3	6.9947	.15079	.08706	6.6201	7.3692	6.89	7.17
	D2	3	6.6413	.00874	.00504	6.6196	6.6630	6.63	6.65
	D3	3	13.1000	.04431	.02558	12.9899	13.2101	13.06	13.15
	D4	3	12.9950	.14994	.08657	12.6225	13.3675	12.89	13.17
D5	3	10.7790	.14760	.08522	10.4123	11.1457	10.67	10.95	

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-25 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D6	3	11.7567	.03993	.02305	11.6575	11.8559	11.71	11.79
D7	3	11.7943	.16404	.09471	11.3868	12.2018	11.61	11.91
Total	24	9.4378	3.90015	.79612	7.7909	11.0847	1.27	13.17
Glucose								
30 D0	3	37.7333	1.91197	1.10388	32.9837	42.4829	36.57	39.94
D1	3	27.1233	.49923	.28823	25.8832	28.3635	26.57	27.54
D2	3	23.2567	.45545	.26295	22.1253	24.3881	22.74	23.60
D3	3	21.9833	.43143	.24909	20.9116	23.0551	21.49	22.29
D4	3	16.4967	.40501	.23383	15.4906	17.5028	16.06	16.86
D5	3	15.1233	.23459	.13544	14.5406	15.7061	14.86	15.31
D6	3	14.8367	1.11518	.64385	12.0664	17.6069	13.71	15.94
D7	3	14.4167	.58526	.33790	12.9628	15.8705	13.77	14.91
Total	24	21.3713	7.76840	1.58572	18.0909	24.6516	13.71	39.94
pH								
30 D0	3	5.9033	.02082	.01202	5.8516	5.9550	5.88	5.92
D1	3	6.7333	.04619	.02667	6.6186	6.8481	6.68	6.76
D2	3	7.2667	.03786	.02186	7.1726	7.3607	7.24	7.31
D3	3	7.5600	.07937	.04583	7.3628	7.7572	7.47	7.62
D4	3	6.5667	.03055	.01764	6.4908	6.6426	6.54	6.60
D5	3	5.6600	.04583	.02646	5.5462	5.7738	5.61	5.70
D6	3	5.5133	.03055	.01764	5.4374	5.5892	5.48	5.54
D7	3	4.8200	.01732	.01000	4.7770	4.8630	4.80	4.83
Total	24	6.2529	.89558	.18281	5.8747	6.6311	4.80	7.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-26 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
D0	3	.3173						
D2	3		.7887					
D1	3			1.3050				
D5	3			1.4330	1.4330			
D6	3				1.5463			
D7	3					1.7640		
D3	3						2.0273	
D4	3							2.5260
Sig.		1.000	1.000	.163	.213	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	1.0557					
D1	3		5.6277				
D2	3		5.7983				
D5	3			9.2590			
D7	3				9.8783		
D6	3				10.1297	10.1297	
D4	3					10.3667	
D3	3						10.9703
Sig.		1.000	.217	1.000	.077	.093	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D2	3	.0550	
D1	3	.0620	
D0	3	.0690	
D6	3	.0807	
D5	3	.0863	
D3	3	.1020	.1020
D4	3	.1027	.1027
D7	3		.1517
Sig.		.150	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	1.4417					
D2	3		6.6413				
D1	3			6.9947			
D5	3				10.7790		
D6	3					11.7567	
D7	3					11.7943	
D4	3						12.9950
D3	3						13.1000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.737	.355

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D7	3	14.4167				
D6	3	14.8367				
D5	3	15.1233	15.1233			
D4	3		16.4967			
D3	3			21.9833		
D2	3			23.2567		
D1	3				27.1233	
D0	3					37.7333
Sig.		.362	.072	.093	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 30

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D7	3	4.8200							
D6	3		5.5133						
D5	3			5.6600					
D0	3				5.9033				
D4	3					6.5667			
D1	3						6.7333		
D2	3							7.2667	
D3	3								7.5600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-27 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone 40	D0	3	.0697	.07741	.04469	-.1226	.2620	.00	.15
	D1	3	1.8397	.50986	.29437	.5731	3.1062	1.25	2.14
	D2	3	1.3550	.08669	.05005	1.1396	1.5704	1.26	1.41
	D3	3	1.7127	.01290	.00745	1.6806	1.7447	1.70	1.73
	D4	3	1.9063	.01589	.00917	1.8669	1.9458	1.89	1.92
	D5	3	2.1477	.08122	.04689	1.9459	2.3494	2.09	2.24
	D6	3	1.8720	.03242	.01872	1.7915	1.9525	1.84	1.91
	D7	3	2.1457	.08373	.04834	1.9377	2.3537	2.05	2.21
	Total	24	1.6311	.66811	.13638	1.3490	1.9132	.00	2.24
Butanol 40	D0	3	.2907	.03326	.01920	.2080	.3733	.25	.32
	D1	3	5.3707	.87632	.50594	3.1938	7.5476	4.84	6.38
	D2	3	7.7117	.04576	.02642	7.5980	7.8254	7.66	7.75
	D3	3	10.3490	.03804	.02196	10.2545	10.4435	10.31	10.39
	D4	3	10.6293	.04910	.02835	10.5074	10.7513	10.59	10.68
	D5	3	9.6560	.06351	.03667	9.4982	9.8138	9.59	9.72
	D6	3	9.9970	.04789	.02765	9.8780	10.1160	9.95	10.05
	D7	3	10.7363	.05405	.03121	10.6021	10.8706	10.68	10.79
	Total	24	8.0926	3.49286	.71298	6.6177	9.5675	.25	10.79
Ethanol 40	D0	3	.0657	.05894	.03403	-.0808	.2121	.00	.11
	D1	3	.0550	.02773	.01601	-.0139	.1239	.04	.09
	D2	3	.0767	.00473	.00273	.0649	.0884	.07	.08
	D3	3	.0937	.00153	.00088	.0899	.0975	.09	.10
	D4	3	.1030	.00361	.00208	.0940	.1120	.10	.11
	D5	3	.1067	.03585	.02070	.0176	.1957	.08	.15
	D6	3	.0987	.00833	.00481	.0780	.1194	.09	.11
	D7	3	.1677	.03889	.02245	.0711	.2643	.12	.19
	Total	24	.0959	.04126	.00842	.0785	.1133	.00	.19
ABE 40	D0	3	.4260	.11505	.06643	.1402	.7118	.31	.54
	D1	3	7.2657	.39534	.22825	6.2836	8.2478	7.00	7.72
	D2	3	9.1433	.12793	.07386	8.8255	9.4611	9.00	9.23
	D3	3	12.1543	.05220	.03014	12.0246	12.2840	12.11	12.21
	D4	3	12.6390	.06402	.03696	12.4800	12.7980	12.58	12.70
	D5	3	11.9097	.17529	.10120	11.4742	12.3451	11.77	12.11
	D6	3	11.9680	.08846	.05107	11.7483	12.1877	11.89	12.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-27 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
	D7	3	13.0493	.17434	.10066	12.6162	13.4824	12.86	13.19
	Total	24	9.8194	4.08937	.83474	8.0926	11.5462	.31	13.19
Glucose 40	D0	3	43.4467	1.56174	.90167	39.5671	47.3262	41.77	44.86
	D1	3	31.8467	.54519	.31477	30.4923	33.2010	31.31	32.40
	D2	3	20.1333	.49217	.28416	18.9107	21.3560	19.60	20.57
	D3	3	21.0867	3.35770	1.93857	12.7457	29.4276	17.26	23.54
	D4	3	21.7333	1.68512	.97291	17.5473	25.9194	20.06	23.43
	D5	3	19.5600	1.12067	.64702	16.7761	22.3439	18.51	20.74
	D6	3	19.6000	.66204	.38223	17.9554	21.2446	18.91	20.23
	Total	24	24.6162	8.38125	1.71082	21.0772	28.1553	17.26	44.86
pH 40	D0	3	5.6033	.01528	.00882	5.5654	5.6413	5.59	5.62
	D1	3	6.9500	.03000	.01732	6.8755	7.0245	6.92	6.98
	D2	3	7.2467	.01155	.00667	7.2180	7.2754	7.24	7.26
	D3	3	7.1100	.03000	.01732	7.0355	7.1845	7.08	7.14
	D4	3	5.2700	.02646	.01528	5.2043	5.3357	5.25	5.30
	D5	3	4.8700	.04359	.02517	4.7617	4.9783	4.82	4.90
	D6	3	4.8233	.01155	.00667	4.7946	4.8520	4.81	4.83
	Total	24	5.8504	1.02215	.20865	5.4188	6.2820	4.81	7.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-28 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.0697			
D2	3		1.3550		
D3	3			1.7127	
D1	3			1.8397	1.8397
D6	3			1.8720	1.8720
D4	3			1.9063	1.9063
D7	3				2.1457
D5	3				2.1477
Sig.		1.000	1.000	.267	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.2907					
D1	3		5.3707				
D2	3			7.7117			
D5	3				9.6560		
D6	3				9.9970	9.9970	
D3	3					10.3490	10.3490
D4	3						10.6293
D7	3						10.7363
Sig.		1.000	1.000	1.000	.201	.187	.170

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D1	3	.0550	
D0	3	.0657	
D2	3	.0767	
D3	3	.0937	
D6	3	.0987	
D4	3	.1030	
D5	3	.1067	
D7	3		.1677
Sig.		.079	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.4260					
D1	3		7.2657				
D2	3			9.1433			
D5	3				11.9097		
D6	3				11.9680		
D3	3				12.1543		
D4	3					12.6390	
D7	3						13.0493
Sig.		1.000	1.000	1.000	.135	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D7	3	19.5233		
D5	3	19.5600		
D6	3	19.6000		
D2	3	20.1333		
D3	3	21.0867		
D4	3	21.7333		
D1	3		31.8467	
D0	3			43.4467
Sig.		.157	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 40

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
D6	3	4.8233							
D5	3		4.8700						
D7	3			4.9300					
D4	3				5.2700				
D0	3					5.6033			
D1	3						6.9500		
D3	3							7.1100	
D2	3								7.2467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-29 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone 50	D0	3	.1150	.12128	.07002	-.1863	.4163	.04	.26
	D1	3	1.7957	.03066	.01770	1.7195	1.8718	1.76	1.82
	D2	3	1.5287	.02205	.01273	1.4739	1.5834	1.51	1.55
	D3	3	1.8077	.02139	.01235	1.7545	1.8608	1.79	1.83
	D4	3	2.0403	.01914	.01105	1.9928	2.0879	2.02	2.06
	D5	3	2.2220	.09182	.05301	1.9939	2.4501	2.17	2.33
	D6	3	2.1283	.03512	.02028	2.0411	2.2156	2.10	2.17
	D7	3	2.3930	.01200	.00693	2.3632	2.4228	2.38	2.41
	Total	24	1.7538	.68611	.14005	1.4641	2.0436	.04	2.41
Butanol 50	D0	3	.1457	.00862	.00498	.1242	.1671	.14	.16
	D1	3	5.4633	.84409	.48733	3.3665	7.5602	4.97	6.44
	D2	3	8.6403	.01834	.01059	8.5948	8.6859	8.63	8.66
	D3	3	10.7020	.05756	.03323	10.5590	10.8450	10.65	10.76
	D4	3	11.2903	.04347	.02510	11.1824	11.3983	11.25	11.34
	D5	3	10.9570	.06902	.03985	10.7855	11.1285	10.89	11.03
	D6	3	10.4783	.04752	.02744	10.3603	10.5964	10.43	10.53
	D7	3	11.1667	.04840	.02794	11.0464	11.2869	11.11	11.21
	Total	24	8.6055	3.77282	.77012	7.0123	10.1986	.14	11.34
Ethanol 50	D0	3	.0860	.07922	.04574	-.1108	.2828	.00	.16
	D1	3	.0580	.01916	.01106	.0104	.1056	.05	.08
	D2	3	.0947	.00907	.00524	.0721	.1172	.09	.11
	D3	3	.1003	.00252	.00145	.0941	.1066	.10	.10
	D4	3	.1217	.00551	.00318	.1080	.1353	.12	.13
	D5	3	.1123	.05818	.03359	-.0322	.2569	.06	.17
	D6	3	.1093	.00681	.00393	.0924	.1262	.10	.12
	D7	3	.1143	.00153	.00088	.1105	.1181	.11	.12
	Total	24	.0996	.03557	.00726	.0846	.1146	.00	.17
ABE 50	D0	3	.3460	.18526	.10696	-.1142	.8062	.20	.56
	D1	3	7.3170	.83409	.48156	5.2450	9.3890	6.82	8.28
	D2	3	10.2637	.02779	.01605	10.1946	10.3327	10.23	10.28
	D3	3	12.6097	.08135	.04697	12.4076	12.8117	12.53	12.70
	D4	3	13.4517	.06752	.03898	13.2839	13.6194	13.39	13.52
	D5	3	13.2917	.20316	.11729	12.7870	13.7963	13.17	13.53
	D6	3	12.7160	.08907	.05142	12.4947	12.9373	12.63	12.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-29 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	13.6740	.06121	.03534	13.5219	13.8261	13.61	13.73
Total	24	10.4587	4.41955	.90214	8.5925	12.3249	.20	13.73
Glucose								
50 D0	3	51.7533	1.52546	.88073	47.9639	55.5428	50.63	53.49
D1	3	33.5633	.46576	.26891	32.4063	34.7203	33.03	33.89
D2	3	26.3433	.60178	.34744	24.8484	27.8382	25.77	26.97
D3	3	24.5500	.32909	.19000	23.7325	25.3675	24.17	24.74
D4	3	23.5233	.69371	.40051	21.8001	25.2466	22.74	24.06
D5	3	24.2867	.71178	.41095	22.5185	26.0548	23.49	24.86
D6	3	24.4400	1.39280	.80414	20.9801	27.8999	22.86	25.49
D7	3	23.9600	.38223	.22068	23.0105	24.9095	23.71	24.40
Total	24	29.0525	9.33325	1.90514	25.1114	32.9936	22.74	53.49
pH 50								
D0	3	5.6333	.03055	.01764	5.5574	5.7092	5.60	5.66
D1	3	6.6233	.60962	.35196	5.1090	8.1377	5.92	7.00
D2	3	7.1133	.03512	.02028	7.0261	7.2006	7.08	7.15
D3	3	7.1733	.03055	.01764	7.0974	7.2492	7.14	7.20
D4	3	6.9867	.06110	.03528	6.8349	7.1384	6.92	7.04
D5	3	5.4233	.24583	.14193	4.8127	6.0340	5.14	5.58
D6	3	5.1933	.16773	.09684	4.7767	5.6100	5.00	5.30
D7	3	5.2233	.15044	.08686	4.8496	5.5971	5.05	5.32
Total	24	6.1713	.86911	.17741	5.8043	6.5382	5.00	7.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-30 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.1150					
D2	3		1.5287				
D1	3			1.7957			
D3	3			1.8077			
D4	3				2.0403		
D6	3				2.1283	2.1283	
D5	3					2.2220	
D7	3						2.3930
Sig.		1.000	1.000	.803	.081	.065	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D0	3	.1457					
D1	3		5.4633				
D2	3			8.6403			
D6	3				10.4783		
D3	3				10.7020	10.7020	
D5	3				10.9570	10.9570	10.9570
D7	3					11.1667	11.1667
D4	3						11.2903
Sig.		1.000	1.000	1.000	.083	.091	.217

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D1	3	.0580
D0	3	.0860
D2	3	.0947
D3	3	.1003
D6	3	.1093
D5	3	.1123
D7	3	.1143
D4	3	.1217
Sig.		.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.3460				
D1	3		7.3170			
D2	3			10.2637		
D3	3				12.6097	
D6	3				12.7160	
D5	3					13.2917
D4	3					13.4517
D7	3					13.6740
Sig.		1.000	1.000	1.000	.685	.178

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D4	3	23.5233			
D7	3	23.9600			
D5	3	24.2867			
D6	3	24.4400			
D3	3	24.5500			
D2	3		26.3433		
D1	3			33.5633	
D0	3				51.7533
Sig.		.211	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 50

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D6	3	5.1933		
D7	3	5.2233		
D5	3	5.4233		
D0	3	5.6333		
D1	3		6.6233	
D4	3		6.9867	6.9867
D2	3			7.1133
D3	3			7.1733
Sig.		.061	.091	.395

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-31 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมัก
อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Acetone 60	D0	3	.0850	.09341	.05393	-.1470	.3170	.00	.19
	D1	3	1.5963	.24490	.14139	.9880	2.2047	1.45	1.88
	D2	3	1.6647	.09986	.05766	1.4166	1.9127	1.58	1.78
	D3	3	1.8970	.01375	.00794	1.8628	1.9312	1.89	1.91
	D4	3	2.1233	.01790	.01033	2.0789	2.1678	2.11	2.14
	D5	3	2.4180	.05226	.03017	2.2882	2.5478	2.37	2.47
	D6	3	2.3053	.03868	.02233	2.2092	2.4014	2.27	2.35
	D7	3	1.5267	.08693	.05019	1.3107	1.7426	1.45	1.62
	Total	24	1.7020	.70503	.14391	1.4043	1.9997	.00	2.47
Butanol 60	D0	3	.0513	.04486	.02590	-.0601	.1628	.00	.08
	D1	3	5.9257	.91919	.53069	3.6423	8.2091	5.39	6.99
	D2	3	8.0653	.02272	.01312	8.0089	8.1218	8.04	8.09
	D3	3	9.8770	.03915	.02261	9.7797	9.9743	9.84	9.92
	D4	3	10.2860	.05145	.02970	10.1582	10.4138	10.24	10.34
	D5	3	11.5873	.05928	.03423	11.4401	11.7346	11.53	11.64
	D6	3	11.6360	.04703	.02715	11.5192	11.7528	11.59	11.68
	D7	3	9.6937	.02458	.01419	9.6326	9.7547	9.67	9.71
	Total	24	8.3903	3.69280	.75379	6.8310	9.9496	.00	11.68
Ethanol 60	D0	3	.0697	.06311	.03643	-.0871	.2264	.00	.12
	D1	3	.0687	.01845	.01065	.0228	.1145	.05	.09
	D2	3	.1137	.04858	.02805	-.0070	.2344	.08	.17
	D3	3	.0857	.00153	.00088	.0819	.0895	.08	.09
	D4	3	.3553	.00839	.00484	.3345	.3762	.35	.37
	D5	3	.1260	.01212	.00700	.0959	.1561	.12	.14
	D6	3	.1103	.00777	.00448	.0910	.1296	.10	.12
	D7	3	.1323	.05479	.03164	-.0038	.2684	.07	.18
	Total	24	.1327	.09376	.01914	.0931	.1723	.00	.37
ABE 60	D0	3	.2060	.16602	.09585	-.2064	.6184	.07	.39
	D1	3	7.5910	1.18232	.68261	4.6540	10.5280	6.89	8.96
	D2	3	9.8437	.16850	.09728	9.4251	10.2622	9.70	10.03
	D3	3	11.8597	.05431	.03135	11.7248	11.9946	11.81	11.92
	D4	3	12.7650	.07835	.04524	12.5704	12.9596	12.70	12.85
	D5	3	14.1310	.12350	.07130	13.8242	14.4378	14.01	14.26
	D6	3	14.0517	.09309	.05374	13.8204	14.2829	13.96	14.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-31 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D7	3	11.3523	.16264	.09390	10.9483	11.7563	11.19	11.51
Total	24	10.2250	4.40505	.89918	8.3650	12.0851	.07	14.26
Glucose								
60 D0	3	66.4000	1.03923	.60000	63.8184	68.9816	65.20	67.00
D1	3	41.8667	.55076	.31798	40.4985	43.2348	41.50	42.50
D2	3	38.6333	.05774	.03333	38.4899	38.7768	38.60	38.70
D3	3	35.7000	.17321	.10000	35.2697	36.1303	35.60	35.90
D4	3	33.6667	.90738	.52387	31.4126	35.9207	33.00	34.70
D5	3	32.9000	.75498	.43589	31.0245	34.7755	32.10	33.60
D6	3	31.7000	.43589	.25166	30.6172	32.7828	31.20	32.00
D7	3	27.5000	4.73181	2.73191	15.7455	39.2545	22.20	31.30
Total	24	38.5458	11.62722	2.37340	33.6361	43.4556	22.20	67.00
pH 60								
D0	3	5.6667	.01528	.00882	5.6287	5.7046	5.65	5.68
D1	3	7.2267	.02517	.01453	7.1642	7.2892	7.20	7.25
D2	3	7.4333	.02517	.01453	7.3708	7.4958	7.41	7.46
D3	3	7.2300	.03000	.01732	7.1555	7.3045	7.20	7.26
D4	3	7.4433	.02309	.01333	7.3860	7.5007	7.43	7.47
D5	3	5.3200	.01000	.00577	5.2952	5.3448	5.31	5.33
D6	3	5.1133	.02517	.01453	5.0508	5.1758	5.09	5.14
D7	3	5.5300	.03606	.02082	5.4404	5.6196	5.50	5.57
Total	24	6.3704	.99836	.20379	5.9488	6.7920	5.09	7.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-32 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในระหว่างการหมักอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Acetone 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.0850				
D7	3		1.5267			
D1	3		1.5963			
D2	3		1.6647			
D3	3			1.8970		
D4	3				2.1233	
D6	3				2.3053	2.3053
D5	3					2.4180
Sig.		1.000	.152	1.000	.053	.214

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	.0513				
D1	3		5.9257			
D2	3			8.0653		
D7	3				9.6937	
D3	3				9.8770	
D4	3				10.2860	
D5	3					11.5873
D6	3					11.6360
Sig.		1.000	1.000	1.000	.051	.858

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D1	3	.0687	
D0	3	.0697	
D3	3	.0857	
D6	3	.1103	
D2	3	.1137	
D5	3	.1260	
D7	3	.1323	
D4	3		.3553
Sig.		.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6		
D0	3	.2060							
D1	3		7.5910						
D2	3			9.8437					
D7	3				11.3523				
D3	3					11.8597			
D4	3						12.7650		
D6	3							14.0517	
D5	3								14.1310
Sig.		1.000	1.000	1.000	.172	1.000			.826

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D7	3	27.5000					
D6	3		31.7000				
D5	3		32.9000	32.9000			
D4	3		33.6667	33.6667			
D3	3			35.7000	35.7000		
D2	3				38.6333		
D1	3					41.8667	
D0	3						66.4000
Sig.		1.000	.218	.086	.061	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH 60

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D6	3	5.1133					
D5	3		5.3200				
D7	3			5.5300			
D0	3				5.6667		
D1	3					7.2267	
D3	3					7.2300	
D2	3						7.4333
D4	3						7.4433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.872	.630

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-33 ความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) อาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Butanol	30	3	10.9703	.03500	.02021	10.8834	11.0573	10.94	11.01
	40	3	10.6303	.04637	.02677	10.5151	10.7455	10.59	10.68
	50	3	11.2903	.04347	.02510	11.1824	11.3983	11.25	11.34
	60	3	11.5867	.05508	.03180	11.4499	11.7235	11.53	11.64
Total	12	11.1194	.37459	.10813		10.8814	11.3574	10.59	11.64
Butanol Yield	30	3	.6367	.07767	.04485	.4437	.8296	.55	.70
	40	3	.4833	.06658	.03844	.3179	.6487	.44	.56
	50	3	.3953	.02120	.01224	.3427	.4480	.38	.42
	60	3	.3467	.02082	.01202	.2950	.3984	.33	.37
Total	12	.4655	.12383	.03575		.3868	.5442	.33	.70
Butanol Productivity	30	3	.1363	.00551	.00318	.1227	.1500	.13	.14
	40	3	.1100	.00000	.00000	.1100	.1100	.11	.11
	50	3	.1160	.00000	.00000	.1160	.1160	.12	.12
	60	3	.1000	.00000	.00000	.1000	.1000	.10	.10
Total	12	.1156	.01406	.00406		.1066	.1245	.10	.14

ตารางที่ จ-34 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของบิวทานอล ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Butanol concentration					
Duncan ^a					
concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
40	3	10.6303			
30	3		10.9703		
50	3			11.2903	
60	3				11.5867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yield Butanol

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
60	3	.3467		
50	3	.3953	.3953	
40	3		.4833	
30	3			.6367
Sig.		.296	.078	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Productivity Butanol

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
60	3	.1000			
40	3		.1100		
50	3			.1160	
30	3				.1363
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-35 ความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
ABE	30	3	13.1000	.04431	.02558	12.9899	13.2101	13.06	13.15
	40	3	12.6400	.06000	.03464	12.4910	12.7890	12.58	12.70
	50	3	13.4517	.06752	.03898	13.2839	13.6194	13.39	13.52
	60	3	14.1333	.12503	.07219	13.8227	14.4439	14.01	14.26
Total	12	12	13.3312	.57358	.16558	12.9668	13.6957	12.58	14.26
ABE Yield	30	3	.7467	.09452	.05457	.5119	.9815	.64	.82
	40	3	.5700	.07937	.04583	.3728	.7672	.51	.66
	50	3	.4650	.02443	.01411	.4043	.5257	.45	.49
	60	3	.4167	.03055	.01764	.3408	.4926	.39	.45
Total	12	12	.5496	.14326	.04136	.4586	.6406	.39	.82
ABE Productivity	30	3	.1617	.00252	.00145	.1554	.1679	.16	.16
	40	3	.1300	.00000	.00000	.1300	.1300	.13	.13
	50	3	.1367	.00252	.00145	.1304	.1429	.13	.14
	60	3	.1167	.00577	.00333	.1023	.1310	.11	.12
Total	12	12	.1363	.01732	.00500	.1252	.1473	.11	.16

ตารางที่ จ-36 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของ ABE ค่าผลได้ (yield) และค่าประสิทธิภาพในการหมัก (productivity) ในอาหาร T6 ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 30 40 50 และ 60 กรัมต่อลิตร ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

ABE concentration

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
40	3	12.6400			
30	3		13.1000		
50	3			13.4517	
60	3				14.1333
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yield ABE

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
60	3	.4167		
50	3	.4650	.4650	
40	3		.5700	
30	3			.7467
Sig.		.387	.082	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

productivity

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
60	3	.1167			
40	3		.1300		
50	3			.1367	
30	3				.1617
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก

ตารางที่ จ-37 ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในการหมักเปลือกเผือก ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Acetone	D0	3	.1592	.06107	.03526	.0075	.3109	.09	.19
Taro	D1	3	2.1626	.84624	.48858	.0604	4.2648	1.67	3.14
	D2	3	1.7152	.84056	.48530	-.3729	3.8033	.74	2.20
	D3	3	1.0815	.11151	.06438	.8045	1.3585	1.02	1.21
	D4	3	1.3226	.05878	.03393	1.1766	1.4686	1.25	1.36
	D5	3	1.5370	.14533	.08391	1.1760	1.8980	1.37	1.62
	D6	3	1.7101	.01172	.00677	1.6810	1.7392	1.70	1.72
	D7	3	1.7951	.12153	.07016	1.4932	2.0970	1.72	1.94
	Total	24	1.4354	.68282	.13938	1.1471	1.7237	.09	3.14
Butanol	D0	3	.5800	.67506	.38974	-1.0969	2.2569	.09	1.35
Taro	D1	3	2.4267	.88794	.51265	.2209	4.6324	1.50	3.27
	D2	3	6.2167	.81144	.46848	4.2009	8.2324	5.29	6.80
	D3	3	9.2133	1.03079	.59513	6.6527	11.7740	8.16	10.22
	D4	3	9.5100	.73729	.42568	7.6785	11.3415	8.97	10.35
	D5	3	10.0333	1.05860	.61118	7.4036	12.6630	8.87	10.94
	D6	3	10.4467	.76461	.44145	8.5473	12.3461	9.59	11.06
	D7	3	10.6700	.56666	.32716	9.2623	12.0777	10.08	11.21
	Total	24	7.3871	3.80478	.77665	5.7805	8.9937	.09	11.21
EtOH	D0	3	.8343	.63012	.36380	-.7310	2.3996	.17	1.43
Taro	D1	3	.7685	.61222	.35347	-.7523	2.2894	.16	1.38
	D2	3	.8294	.59178	.34167	-.6407	2.2995	.16	1.26
	D3	3	.8921	.64953	.37500	-.7215	2.5056	.17	1.42
	D4	3	.8320	.62090	.35848	-.7104	2.3743	.17	1.40
	D5	3	.8298	.58477	.33762	-.6228	2.2825	.19	1.34
	D6	3	.9786	.69483	.40116	-.7475	2.7046	.18	1.39
	D7	3	.9044	.65797	.37988	-.7301	2.5389	.19	1.48
	Total	24	.8586	.52999	.10818	.6348	1.0824	.16	1.48
ABE	D0	3	1.5733	.89030	.51401	-.6383	3.7850	.67	2.45
Taro	D1	3	5.3633	2.11105	1.21882	.1192	10.6075	3.95	7.79
	D2	3	8.7567	.18583	.10729	8.2950	9.2183	8.55	8.91
	D3	3	11.1867	.83764	.48361	9.1059	13.2675	10.26	11.89
	D4	3	11.6667	.36088	.20835	10.7702	12.5631	11.25	11.88
	D5	3	12.4033	.83429	.48168	10.3309	14.4758	11.45	13.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี อนุญาตให้นำไปใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่สู่สาธารณะโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-37 (ต่อ) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในการหมัก
เปลือกเผือก ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
D6	3	13.1400	.55245	.31896	11.7676	14.5124	12.70	13.76
D7	3	13.3700	.68037	.39281	11.6799	15.0601	12.85	14.14
Total	24	9.6825	4.10956	.83886	7.9472	11.4178	.67	14.14
Glucose D0	3	68.9000	1.21655	.70238	65.8779	71.9221	67.50	69.70
D1	3	57.4667	3.52326	2.03415	48.7144	66.2189	54.60	61.40
D2	3	48.1667	5.45374	3.14872	34.6188	61.7145	42.60	53.50
D3	3	49.9667	3.78726	2.18658	40.5586	59.3747	45.80	53.20
D4	3	46.8667	3.12623	1.80493	39.1007	54.6327	44.00	50.20
D5	3	46.3333	4.14045	2.39049	36.0479	56.6188	41.90	50.10
D6	3	45.4333	4.12957	2.38421	35.1749	55.6917	40.70	48.30
D7	3	46.5333	3.85011	2.22286	36.9691	56.0975	42.70	50.40
Total	24	51.2083	8.38186	1.71094	47.6690	54.7477	40.70	69.70
pH D0	3	5.2433	.00577	.00333	5.2290	5.2577	5.24	5.25
D1	3	5.2267	.02082	.01202	5.1750	5.2784	5.21	5.25
D2	3	5.6300	.06557	.03786	5.4671	5.7929	5.57	5.70
D3	3	5.7900	.70930	.40951	4.0280	7.5520	5.28	6.60
D4	3	5.2433	.85541	.49387	3.1184	7.3683	4.71	6.23
D5	3	4.7233	.11150	.06438	4.4463	5.0003	4.64	4.85
D6	3	4.6800	.05292	.03055	4.5486	4.8114	4.64	4.74
D7	3	4.6633	.04509	.02603	4.5513	4.7753	4.62	4.71
Total	24	5.1500	.52845	.10787	4.9269	5.3731	4.62	6.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-38 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นของตัวทำละลาย ความเข้มข้นกลูโคส และค่า pH ในการหมักเปลือกเผือก ด้วยเชื้อ *Clostridium sp. G10*

Acetone Taro

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D0	3	.1592		
D3	3		1.0815	
D4	3		1.3226	
D5	3		1.5370	1.5370
D6	3		1.7101	1.7101
D2	3		1.7152	1.7152
D7	3		1.7951	1.7951
D1	3			2.1626
Sig.		1.000	.087	.126

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Butanol Taro

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D0	3	.5800			
D1	3		2.4267		
D2	3			6.2167	
D3	3				9.2133
D4	3				9.5100
D5	3				10.0333
D6	3				10.4467
D7	3				10.6700
Sig.		1.000	1.000	1.000	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol Taro

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05
		1
D1	3	.7685
D2	3	.8294
D5	3	.8298
D4	3	.8320
D0	3	.8343
D3	3	.8921
D7	3	.9044
D6	3	.9786
Sig.		.721

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ABE Taro

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0	3	1.5733				
D1	3		5.3633			
D2	3			8.7567		
D3	3				11.1867	
D4	3				11.6667	11.6667
D5	3				12.4033	12.4033
D6	3					13.1400
D7	3					13.3700
Sig.		1.000	1.000	1.000	.165	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glucose

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
D6	3	45.4333		
D5	3	46.3333		
D7	3	46.5333		
D4	3	46.8667		
D2	3	48.1667		
D3	3	49.9667		
D1	3		57.4667	
D0	3			68.9000
Sig.		.212	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

pH

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D7	3	4.6633	
D6	3	4.6800	
D5	3	4.7233	
D1	3	5.2267	5.2267
D0	3	5.2433	5.2433
D4	3	5.2433	5.2433
D2	3		5.6300
D3	3		5.7900
Sig.		.128	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-39 ความเข้มข้นของบิวทานอลที่ได้การหมักเปลือกเผือกและหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ

Clostridium sp. G10

Descriptives

Butanol

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TD0	3	.5800	.67506	.38974	-1.0969	2.2569	.09	1.35
TD1	3	2.4267	.88794	.51265	.2209	4.6324	1.50	3.27
TD2	3	6.2167	.81144	.46848	4.2009	8.2324	5.29	6.80
TD3	3	9.2133	1.03079	.59513	6.6527	11.7740	8.16	10.22
TD4	3	9.5100	.73729	.42568	7.6785	11.3415	8.97	10.35
TD5	3	10.0333	1.05860	.61118	7.4036	12.6630	8.87	10.94
TD6	3	10.4467	.76461	.44145	8.5473	12.3461	9.59	11.06
TD7	3	10.6700	.56666	.32716	9.2623	12.0777	10.08	11.21
GD0	3	.0467	.04041	.02333	-.0537	.1471	.00	.07
GD1	3	5.9233	.92376	.53333	3.6286	8.2181	5.39	6.99
GD2	3	8.0600	.01732	.01000	8.0170	8.1030	8.04	8.07
GD3	3	9.8667	.04619	.02667	9.7519	9.9814	9.84	9.92
GD4	3	10.2733	.05774	.03333	10.1299	10.4168	10.24	10.34
GD5	3	11.5600	.06928	.04000	11.3879	11.7321	11.52	11.64
GD6	3	11.6200	.05196	.03000	11.4909	11.7491	11.59	11.68
GD7	3	9.6900	.01732	.01000	9.6470	9.7330	9.67	9.70
Total	48	7.8835	3.74061	.53991	6.7974	8.9697	.00	11.68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-40 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้รับการหมักเปลือกเฟือก
และหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

Butanol

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
GD0	3	.0467						
TD0	3	.5800						
TD1	3		2.4267					
GD1	3			5.9233				
TD2	3			6.2167				
GD2	3				8.0600			
TD3	3					9.2133		
TD4	3					9.5100	9.5100	
GD7	3					9.6900	9.6900	
GD3	3					9.8667	9.8667	
TD5	3					10.0333	10.0333	
GD4	3					10.2733	10.2733	
TD6	3						10.4467	
TD7	3						10.6700	10.6700
GD5	3							11.5600
GD6	3							11.6200
Sig.		.310	1.000	.574	1.000	.079	.058	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-41 ความเข้มข้นของ ABE ที่ได้การหมักเปลือกเผือกและหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ
Clostridium sp. G10

Descriptives

ABE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
TD0	3	1.5733	.89030	.51401	-.6383	3.7850	.67	2.45
TD1	3	5.3633	2.11105	1.21882	.1192	10.6075	3.95	7.79
TD2	3	8.7567	.18583	.10729	8.2950	9.2183	8.55	8.91
TD3	3	11.1867	.83764	.48361	9.1059	13.2675	10.26	11.89
TD4	3	11.6667	.36088	.20835	10.7702	12.5631	11.25	11.88
TD5	3	12.4033	.83429	.48168	10.3309	14.4758	11.45	13.00
TD6	3	13.1400	.55245	.31896	11.7676	14.5124	12.70	13.76
TD7	3	13.3700	.68037	.39281	11.6799	15.0601	12.85	14.14
GD0	3	.2033	.15948	.09207	-.1928	.5995	.07	.38
GD1	3	7.5867	1.18938	.68669	4.6321	10.5413	6.89	8.96
GD2	3	9.8367	.15822	.09135	9.4436	10.2297	9.70	10.01
GD3	3	11.8500	.06083	.03512	11.6989	12.0011	11.81	11.92
GD4	3	12.7533	.08386	.04842	12.5450	12.9617	12.70	12.85
GD5	3	14.1100	.13229	.07638	13.7814	14.4386	14.01	14.26
GD6	3	14.0367	.10017	.05783	13.7878	14.2855	13.96	14.15
GD7	3	11.3500	.15524	.08963	10.9644	11.7356	11.19	11.50
Total	48	9.9492	4.22077	.60922	8.7236	11.1748	.07	14.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ-42 การเปรียบเทียบทางสถิติของความเข้มข้น ABE ที่ได้รับการหมักเปลือกเปลือก
และหมักกลูโคส ด้วยเชื้อ *Clostridium* sp. G10

ABE

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GD0	3	.2033										
TD0	3		1.5733									
TD1	3			5.3633								
GD1	3				7.5867							
TD2	3				8.7567	8.7567						
GD2	3					9.8367						
TD3	3						11.1867					
GD7	3						11.3500					
TD4	3						11.6667	11.6667				
GD3	3						11.8500	11.8500	11.8500			
TD5	3						12.4033	12.4033	12.4033	12.4033		
GD4	3							12.7533	12.7533	12.7533	12.7533	
TD6	3								13.1400	13.1400	13.1400	
TD7	3									13.3700	13.3700	
GD6	3											14.0367
GD5	3											14.1100
Sig.		1.000	1.000	1.000	.067	.089	.086	.116	.063	.161		.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวบุษบา บัวเขียว
วัน เดือน ปีเกิด	19 มีนาคม 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	104 หมู่ 7 ตำบลป่าแฝก อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา 56130
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ปี 2558 เกรดเฉลี่ย 3.22
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ (สจล.)
ผลงานทางวิชาการ	1. Buakhaw, B. and Sanguanchaipaiwong, V. 2017. "Effect of Media on Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by Isolated <i>Clostridium</i> spp." <i>Energy Procedia</i> . 138 (2017) 864-869 2. บุษบา บัวเขียว สิริมา สัตย์ชาพงษ์ อภิญญา สุทธิสารศักดิ์ อรรพรรณ เทียบภู และ วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์. 2560. "การผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล โดยใช้เปลือกเผือกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยเชื้อ <i>Clostridium</i> spp. ที่คัดแยกได้." การประชุมวิชาการเครือข่ายพลังงานแห่งประเทศไทยครั้งที่ 13, โรงแรม ดิเอ็มเพรส เชียงใหม่, 31 พฤษภาคม-2 มิถุนายน 2560. หน้า 154-160

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้