สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 4

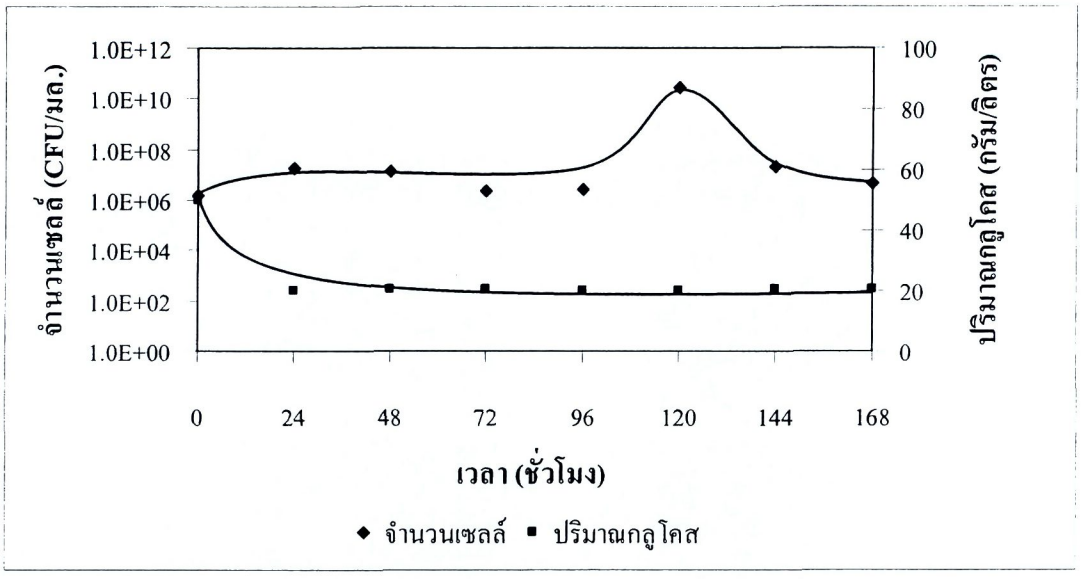
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1

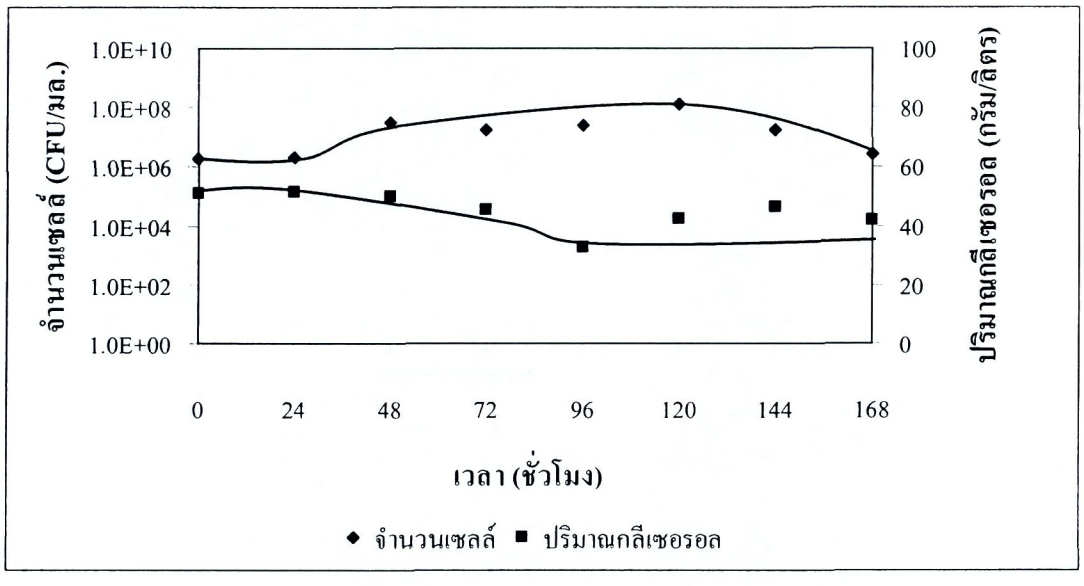
4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงเดียวของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ เริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารแข็ง reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน anaerobic jar ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้อากาศ และนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 168 ชั่วโมง

จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน(pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-4}, 10^{-6} และ10^{-8} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/mL) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสและกลีเซอรอลโดยเครื่อง HPLC ได้ผลการทดลองตามรูปที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 และ 4.2



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.1 ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณแหล่งอาหารที่เหลืออยู่ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ก) ในอาหารชุดควบคุมที่มีกลูโคสและ (ข) ในอาหารที่มีกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.1 ผลของการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU/mL)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.43 \pm 0.24 \times 10^{6})^{b}$	50.0
24	$(1.80 \pm 0.20 \times 10^{7})^{b}$	20.1
48	$(1.33 \pm 0.31 \times 10^{7})^{b}$	20.4
72	$(2.33 \pm 1.53 \times 10^{6})^{b}$	20.5
96	$(2.67 \pm 1.53 \times 10^{6})^{b}$	20.0
120	$(2.67 \pm 1.53 \times 10^{10})^{a}$	19.9
144	$(2.13 \pm 0.85 \times 10^{7})^{b}$	20.5
168	$(4.33 \pm 2.08 \times 10^{6})^{b}$	20.6

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากรูปที่ 4.1 (ก) และตารางที่ 4.1 พบว่าในกระบวนการหมักโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในชุดควบคุมซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลูโคส เมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นจำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มีค่าเท่ากับ 2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร และมีการใช้ปริมาณกลูโคสไปประมาณ 30 กรัมต่อลิตร จากนั้น ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มีค่าลดลงตามเวลาที่ผ่านไป โดยที่ 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีจำนวนเซลล์เหลือ 2.13×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และที่ 168 ชั่วโมง มีเชื้อจุลินทรีย์รอดอยู่เพียง 4.33×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.2 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.97 \pm 0.28 \times 10^{6})^{c}$	51.0
24	$(2.20 \pm 0.13 \times 10^{6})^{c}$	51.5
48	$(3.23 \pm 0.23 \times 10^{7})^{b}$	50.0
72	$(1.67 \pm 0.06 \times 10^{7})^{bc}$	45.5
96	$(2.47 \pm 0.23 \times 10^{7})^{b}$	32.5
120	$(1.33 \pm 0.29 \times 10^{8})^{a}$	42.5
144	$(1.70 \pm 0.46 \times 10^{7})^{bc}$	46.5
168	$(2.66 \pm 1.20 \times 10^{6})^{c}$	42.0

หมายเหตุ a, b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในขณะที่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (รูปที่ 4.1 ข และตารางที่ 4.2) เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป จำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 มี 1.33×10^{8} CFU/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากกลูโคสแล้ว (2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร) มีค่าน้อยกว่าถึง 200 เท่า อันน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้ จากรายงานของ Durre (2008) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี จากนั้นจำนวนเซลล์ก็ จะมีปริมาณลดลงตามเวลาที่ผ่านไป โดยที่ 144 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบเชื้อจุลินทรีย์ 1.70×10^{7} CFU ต่อมิลลิลิตร และนับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ได้ 2.66×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ 168 ชั่วโมง ส่วนปริมาณกลีเซอรอลก็จะแปรผันตามจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR

1462 ใช้กลีเซอรอลไปเป็นแหล่งพลังงานประมาณ 18.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลนั้นจะมีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ไปในทางเดียวกับชุดควบคุมซึ่งมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 โดยนำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อเป็น internal standard จากนั้น นำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก เมทานอล และกรดบิวทิวเรต ด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบบิวทานอล อะซิโตน หรือเอทานอลซึ่งเป็น 3 สารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรพบตามเมทาบอริซึม (Durre, 2008) ทั้งจากสองสารอาหารตั้งต้น

อย่างไรก็ตาม กลับพบว่าสารที่เกิดขึ้น คือ เมทานอล (ความเข้มข้นแสดงดังในตารางที่ 4.3 และโครมาโตแกรมของตัวอย่าง เทียบกับโครมาโตแกรมของบิวทานอลมาตรฐานแสดงในรูป ก.5 ภาคผนวก ก) เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีรายงานของ Maintinguer และคณะ (2008) ว่าเมทานอลเป็นสารตัวกลางในการผลิตไฮโดรเจนของเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากบ่อบำบัดน้ำเสียซึ่งมี *Clostridium acetobutyricum* อยู่ด้วย แสดงว่างานวิจัยนี้อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจน และเกิดเมทานอลเป็นสารตัวกลางในเมทาบอริซึม สังเกตจากตารางที่ 4.3 พบว่าความเข้มข้นของเมทานอลมีค่าลดลงตามเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ผ่านไป

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Schink และ Zeikus (1980) ว่าเชื้อ *Clostridium* สามารถผลิตเมทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อใช้เพคตินเป็นสารอาหารตั้งต้น แต่ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นเพื่อใช้ในการผลิตเมทานอลได้ ซึ่งก็สอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ ซึ่งเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร จะพบซอร์บิทอลอยู่ในส่วนใส โดยที่ไม่พบสารนี้เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณของซอร์บิทอลนี้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงคือ 0.53 กรัมต่อลิตร ซึ่งน่าจะเป็นน้ำตาลที่ปนเปื้อนมาในกลูโคสที่ใช้เป็นสารอาหาร เพราะมีค่าความเข้มข้นคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งแสดงว่าเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้ สอดคล้องกับรายงานของ Mitchell (1996) ที่ทำการทดลองหาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* (เปลี่ยนชื่อจาก *Clostridium acetobutylicum*) NCIMB 8052 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้น้ำตาลซอร์บิทอลได้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเมทานอลที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเมทานอล (กรัมต่อลิตร)
0	17.30
24	14.63
48	11.97
72	9.00
96	7.97
120	6.75
144	4.00
168	7.78

4.1.2 การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อหาการเจริญเติบโตของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่เหมาะสมเพื่อนำมาอ้างอิงเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงหาปริมาณของกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นการทดลองต่อไป โดยเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร

โดยพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงที่ 120 จะพบว่ามีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นจำนวนดังต่อไปนี้ 5.73×10^5, 1.97×10^8, 1.64×10^8, 5.33×10^8 และ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ยังพบว่ามีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากที่สุดที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์เป็น 5.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง

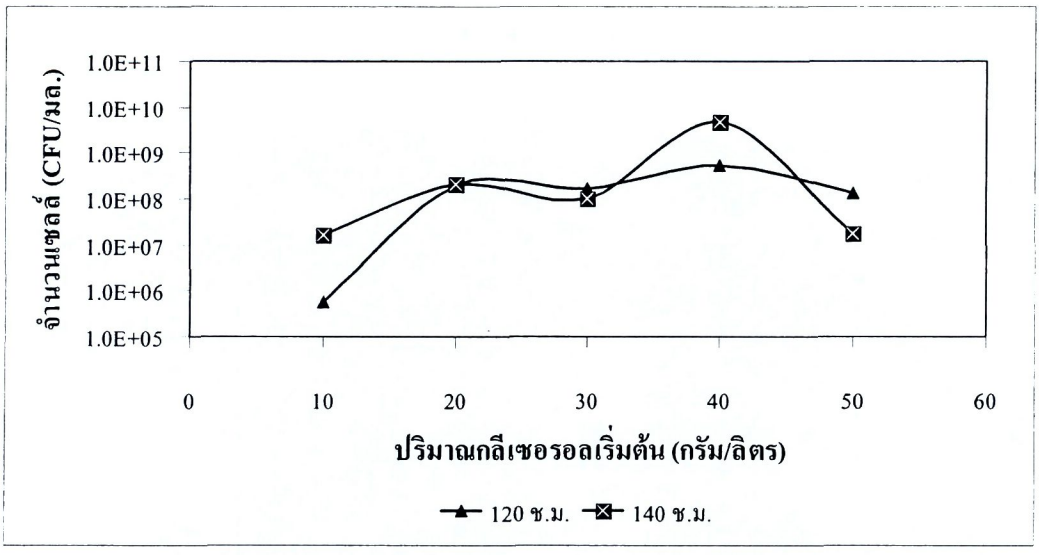
ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตชั่วโมงที่ 120 (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
10	$(5.73\pm0.22 \times 10^{5})^{b}$	nd
20	$(1.97\pm0.16 \times 10^{8})^{b}$	nd
30	$(1.64 \pm0.31 \times 10^{8})^{b}$	17.00
40	$(5.33\pm0.25 \times 10^{8})^{a}$	39.50
50	$(1.33 \pm0.29 \times 10^{8})^{b}$	42.50

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง

ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ชั่วโมงที่ 144 (CFU/mL)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
10	$(1.63 \pm0.40 \times 10^{7})^{b}$	nd
20	$(2.01\pm0.86 \times 10^{8})^{b}$	nd
30	$(1.00\pm0.20 \times 10^{8})^{b}$	17.00
40	$(4.80 \pm0.85 \times 10^{9})^{a}$	36.00
50	$(1.70\pm0.46 \times 10^{7})^{b}$	46.50

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด



รูปที่ 4.2 ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* สูงสุด ที่ 120 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอ-รอลเริ่มต้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และที่ 144 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร

และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะพบว่ามีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เป็นจำนวนดังต่อไปนี้ 1.63×10^7, 2.01×10^8, 1.00×10^8, 4.80×10^9 และ 1.70×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตที่ 120 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นตามปริมาณของกลีเซอรอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดลงเมื่อมีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร และมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 4.80×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.2

เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อใช้ปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 กรัมต่อลิตร 20 กรัมต่อลิตรและ 30 กรัมต่อลิตร จะมีจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงคือ 1.63×10^7, 2.01×10^8 และ 4.80×10^9 CFU ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร จะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือ 1.64×10^8 และ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำผลจำนวนเซลล์ที่ได้จากการหมักมาเปรียบเทียบกันทางสถิติจะพบว่าการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 144 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 4.80×10^9 CFU ต่อ

มิลลิลิตร ในขณะเดียวกันนั้นจะพบว่าปริมาณกลีเซอรอลนั้นจะมีค่าลดลงมากที่สุดในการหมักที่มีปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร โดยใช้ไปในการเจริญเติบโตประมาณ 13 กรัมต่อลิตร

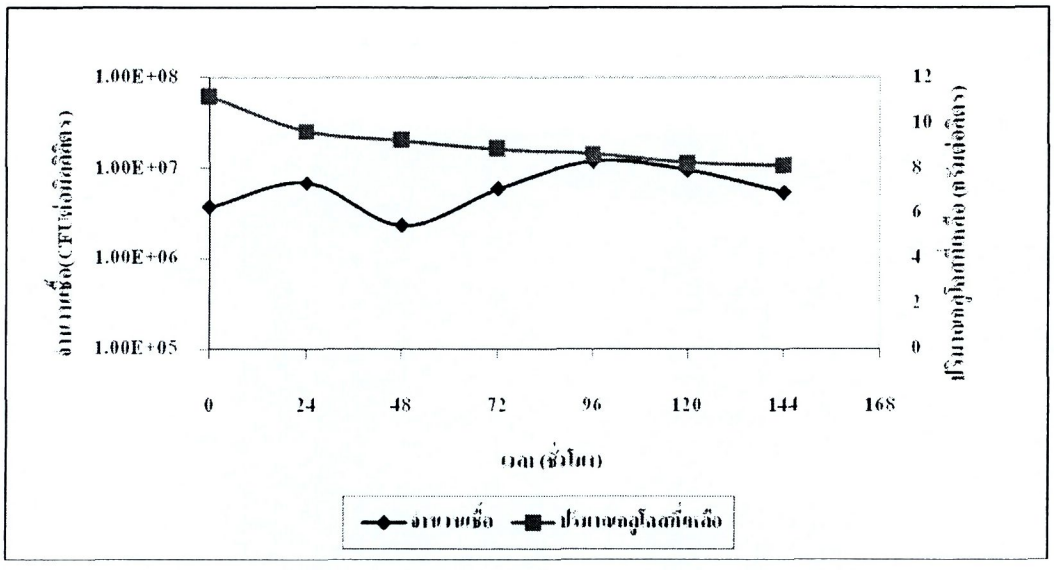
4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2

4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยเริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารเหลว Reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยบ่มไร้อากาศ (Aaerobic jar) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงในอาหารเหลว GYCC ปริมาตร 45 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้อากาศ นำไปเลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 144 ชั่วโมง

จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยเทคนิคการ Pour plate ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFUต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี DNS ของ Miller ส่วนใสที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิตริก และกรดบิวทิวเรตด้วยเครื่อง HPLC

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้มากที่สุด เมื่อการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 96 ชั่วโมง ได้ 1.20 $\times 10^{7}$ CFU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้วไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อจุลินทรีย์ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันมากเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่มีค่าสูง



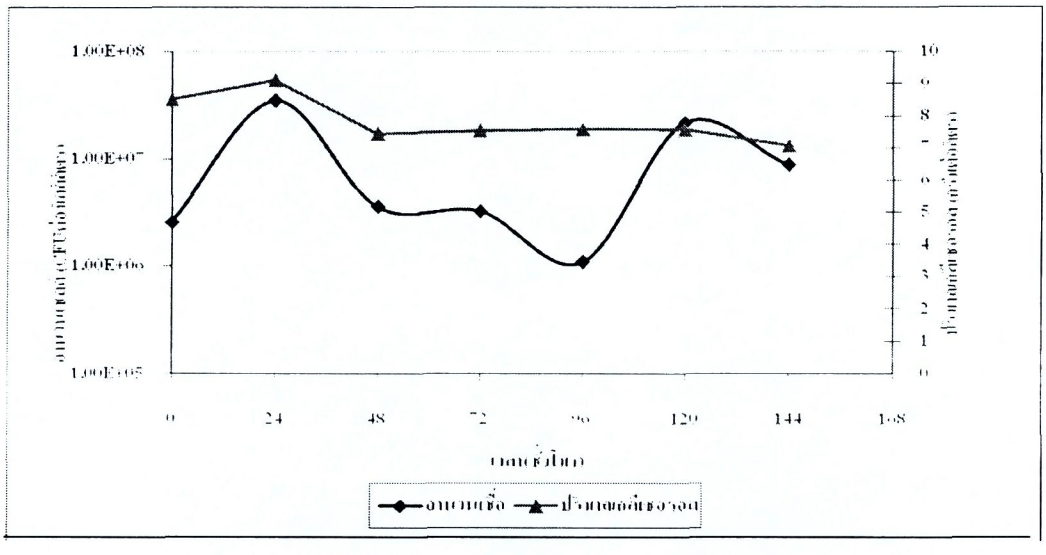
รูปที่ 4.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

ตารางที่ 4.6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(3.70 \pm 1.21 \times 10^{6})^{b}$	11.15
24	$(6.88 \pm 3.34 \times 10^{6})^{b}$	9.63
48	$(2.32 \pm 0.20 \times 10^{6})^{b}$	9.23
72	$(5.93 \pm 5.96 \times 10^{6})^{b}$	8.85
96	$(1.20 \pm 1.66 \times 10^{7})^{b}$	8.63
120	$(9.57 \pm 4.86 \times 10^{6})^{b}$	8.25
144	$(5.33 \pm 5.33 \times 10^{7})^{a}$	8.10

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี จากชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 3.70 $\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 6.88 $\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ต่อมาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตจะลดลงเล็กน้อยเป็น 2.32 $\times 10^5$ CFUต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 96 มีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ 1.20 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร และลดลงจนมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.33$\times 10^6$ CFUต่อมิลลิลิตร เมื่อจบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 144 ชั่วโมง ส่วนการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตของเชื้อพบว่าใช้ปริมาณน้ำตาลไปประมาณ 1.52 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 11.15 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 9.63 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อที่มีชีวิตของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีแนวโน้มสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง จากการใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 144) มีปริมาณลดลงไม่มากนักจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ส่วนผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC (ไม่ได้นำมาแสดง) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆทั้งอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล



รูปที่ 4.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

ตารางที่ 4.7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อ มิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.57 \pm 2.20 \times 10^{6})^{b}$	$(8.52 \pm 0.08)^{a}$
24	$(3.47 \pm 1.60 \times 10^{7})^{a}$	$(9.12 \pm 0.55)^{a}$
48	$(3.56 \pm 3.38 \times 10^{6})^{b}$	$(7.45 \pm 0.02)^{b}$
72	$(3.23 \pm 1.50 \times 10^{6})^{b}$	$(7.55 \pm 0.03)^{b}$
96	$(1.10 \pm 1.57 \times 10^{6})^{b}$	$(7.60 \pm 0.09)^{b}$
120	$(2.16 \pm 3.35 \times 10^{7})^{ab}$	$(7.57 \pm 0.92)^{b}$
144	$(8.73 \pm 3.78 \times 10^{6})^{ab}$	$(7.07 \pm 0.76)^{b}$

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

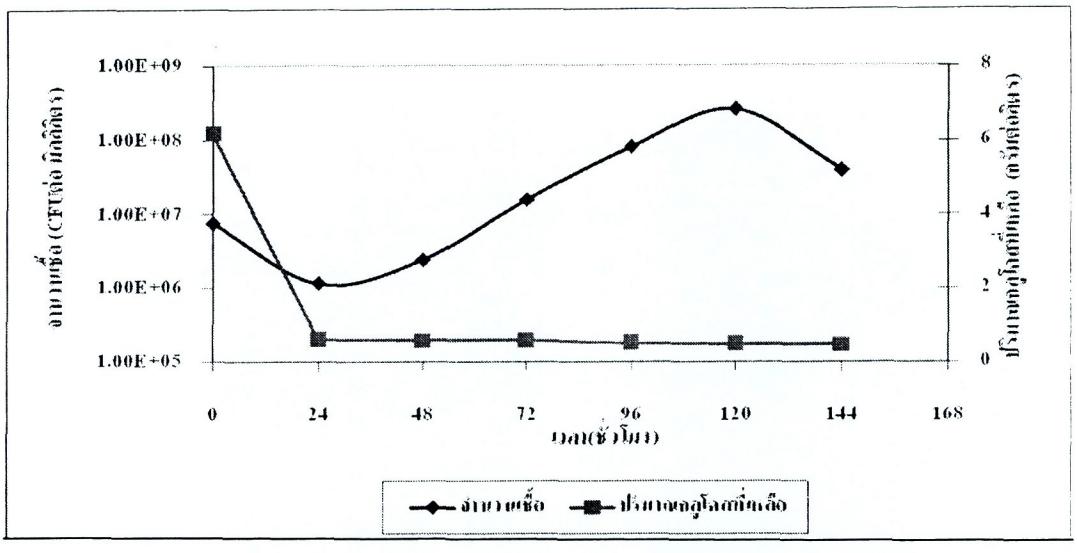
จากรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.7 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดนับได้ 3.47×10^{7} CFUต่อมิลลิลิตร แต่มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 120 และ 144 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 2.16×10^{7} และ 8.73×10^{6} CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าการเจริญเติบโตของเชื้อมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยดังจะเห็นได้จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานซึ่งมีค่าสูงเหมือนกรณีการใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยง นั่นคือเชื้อ 3 ฟลาสก์มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ส่วนการใช้กลีเซอรอลของเชื้อเพื่อการเจริญเติบโตจะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถใช้กลีเซอรอลได้ โดยกลีเซอรอลลดลงทั้งหมด 2.05 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ปริมาณกลีเซอรอลมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจากการใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ปริมาณกลีเซอรอลในชั่วโมงสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมงมีค่าลดลงไม่มากจากปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น ส่วนผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC (ไม่ได้นำมาแสดง) ไม่พบสารผลิตภัณฑ์ใดๆ ทั้งอะซิโตน บิวทานอล และ เอทานอล เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงด้วยกลูโคส

จากรายงานของ รติกร รัตน์ติณา และ ชุติมา (2552) ศึกษาการนำกลีเซอรอลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสโดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มาทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะไร้อากาศในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเท่ากับ 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้เท่ากับ 4.80×10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

เนื่องจากการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากันของเชื้อทั้ง 3 ฟลาสก์ จึงได้มีการทดลองในระดับ ถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ไร้ออกซิเจนแน่นอน โดยในขั้นแรกจะทำการทดลองเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสกับที่ใช้กลีเซอรอลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว และในขั้นตอนต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดซึ่งมีอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที

4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัด

จากรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัดโดยมีกลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่ 24 มีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.16×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดการปรับตัวภายในถังหมัก และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.60×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากชั่วโมงอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.18 กรัมต่อลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดนั้นปริมาณกลูโคสเหลือเพียง 0.48 กรัมต่อลิตร เท่ากับมีการใช้น้ำตาลไป 5.7 กรัมต่อลิตร กล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณน้ำตาลกลูโคสแปรผันกัน



รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)

ตารางที่ 4.8 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

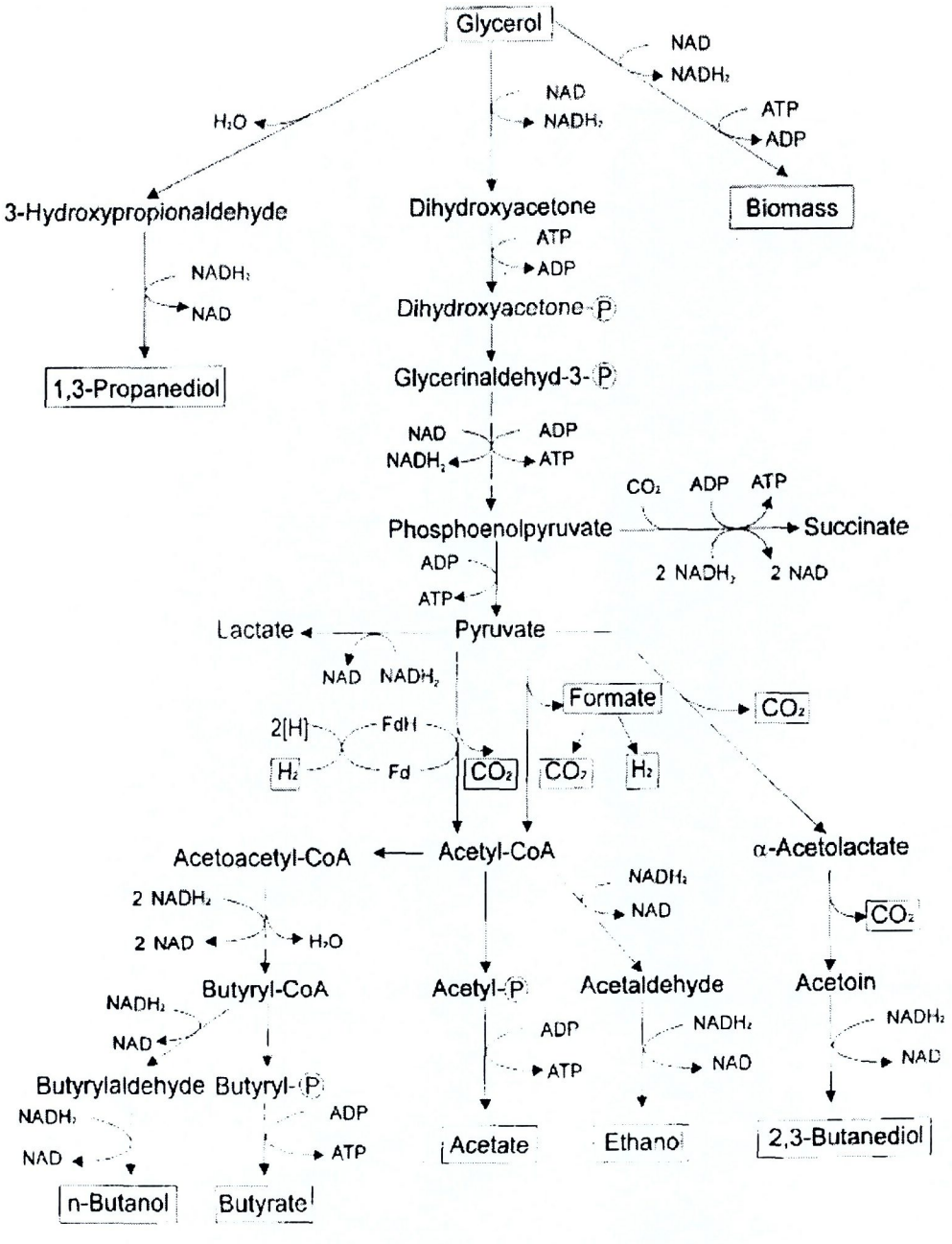
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(7.57 \pm 0.27 \times 10^{6})^{c}$	6.18	6.00
24	$(1.16 \pm 0.38 \times 10^{6})^{c}$	0.59	5.09
48	$(2.43 \pm 0.57 \times 10^{6})^{c}$	0.58	5.26
72	$(1.59 \pm 0.97 \times 10^{7})^{bc}$	0.57	5.31
96	$(8.03 \pm 5.44 \times 10^{7})^{b}$	0.50	5.35
120	$(2.60 \pm 0.57 \times 10^{8})^{a}$	0.48	5.38
144	$(3.93 \pm 0.40 \times 10^{7})^{bc}$	0.47	5.41

หมายเหตุ a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ อังคณา มุขพลอย (2549) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลจากสารสกัดฟางข้าวโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 ศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่ดีที่สุดประกอบด้วย กลูโคสที่มีอยู่ในน้ำคั้นฟางข้าว 70.27 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.56 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก พี เอช (pH) เริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะในสภาวะไร้อากาศที่ทำให้เชื้อ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด (2.64 กรัมต่อลิตร) คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช (pH) เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

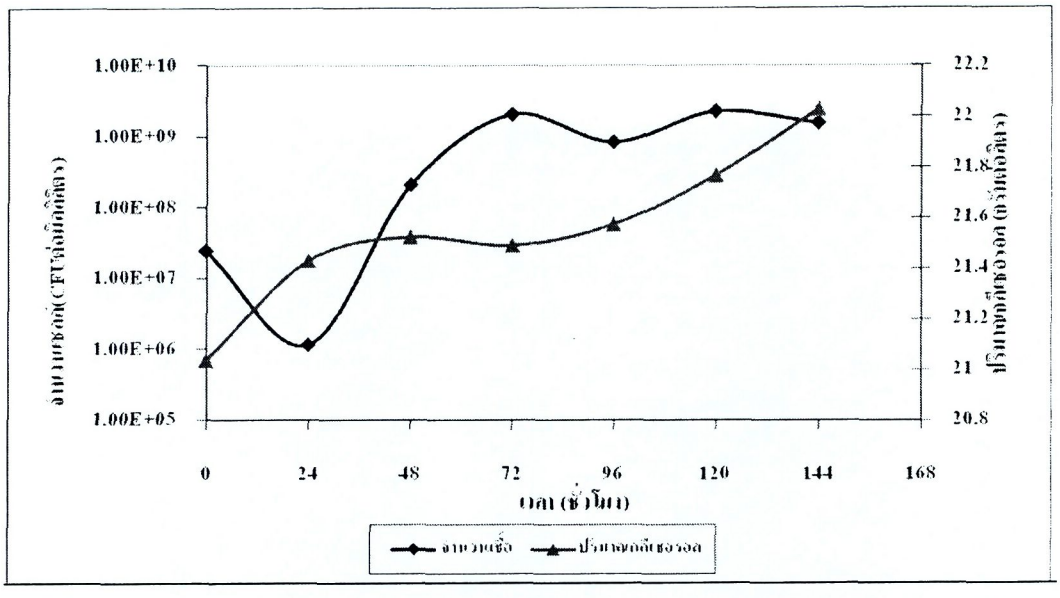
ผลการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลกลูโคส มีการผลิตเอทานอล 0.180 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นหนึ่งในสามผลิตภัณฑ์หลักที่ประกอบไปด้วยอะซิโตน บิวทานอล เอทานอลและ1,3-โพรเพนไดออล 0.031 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบได้จากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

จากรูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.9 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัดนั้น พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตลดลงเหมือนกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงจาก 4.43 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 0 ไปเป็น 1.16 $\times 10^5$ CFUต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์กลับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 คือมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ 2.24 $\times 10^8$ CFUต่อมิลลิลิตร การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการเจริญที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการสังเกตที่ค่าพีเอช (pH) พบว่า ค่าพีเอช (pH) ที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.67 และเพิ่มขึ้นเป็น 6.98 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 พีเอช (pH) มีค่าลดลง แสดงว่ามีการสร้างกรดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 4.6 วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม

ที่มา : Biebl และคณะ (1999)



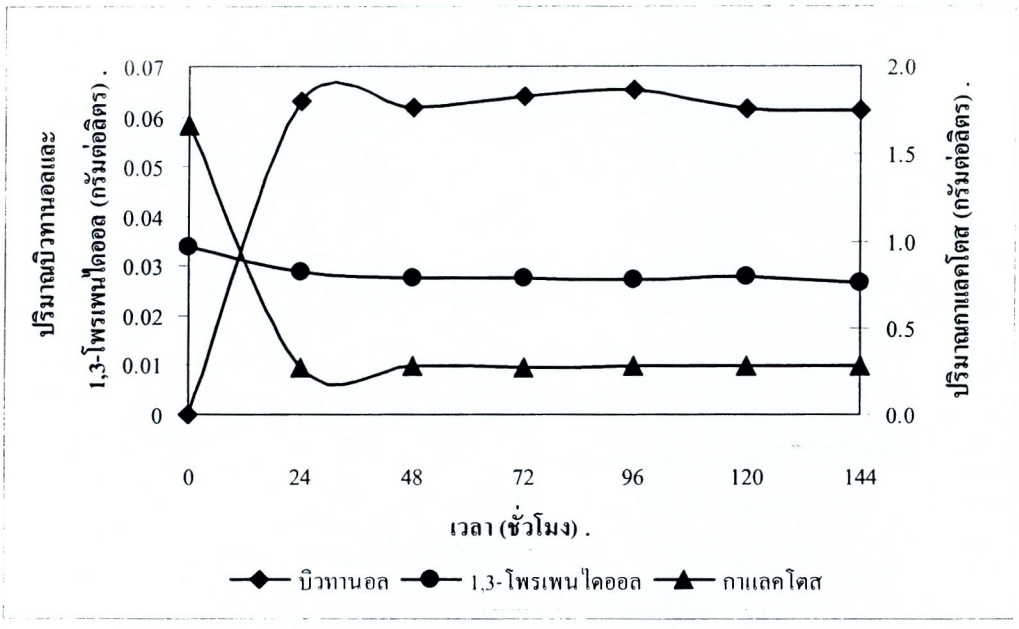
รูปที่ 4.7 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

ตารางที่ 4.9 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(2.43 \pm 0.42 \times 10^{7})^{d}$	$(21.07 \pm 0.13)^{d}$	6.76
24	$(1.16 \pm 0.38 \times 10^{6})^{d}$	$(21.43 \pm 0.21)^{c}$	6.98
48	$(2.08 \pm 0.45 \times 10^{8})^{d}$	$(21.52 \pm 0.16)^{c}$	6.11
72	$(2.03 \pm 0.70 \times 10^{9})^{ab}$	$(21.49 \pm 0.11)^{c}$	5.98
96	$(8.27 \pm 0.38 \times 10^{8})^{c}$	$(21.57 \pm 0.13)^{bc}$	6.04
120	$(2.24 \pm 0.17 \times 10^{9})^{a}$	$(21.77 \pm 0.11)^{b}$	6.05
144	$(1.54 \pm 0.21 \times 10^{9})^{b}$	$(22.03 \pm 0.01)^{a}$	6.06

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อพิจารณาผลความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ไม่มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญเติบโตและการผลิตสารผลิตภัณฑ์จากรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.10 จะพบบิวทานอลเฉลี่ยประมาณ 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 144 นอกจากนี้ยังพบ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยประมาณ 0.029 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และยังพบกาแลคโตสซึ่งมีปริมาณลดลงจาก 1.662 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเหลือเป็นประมาณ 0.275 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงและมีปริมาณคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเจริญเติบโตและการสร้างสารผลิตภัณฑ์ของเชื้ออาจมาจากกาแลค-โตสในเคซีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร GYCC



รูปที่ 4.8 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.034 ±0.000[a]	1.662 ±0.043[a]
24	0.063 ±0.006[a]	0.029 ±0.001[b]	0.275 ±0.003[b]
48	0.062 ±0.004[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
72	0.064 ±0.002[a]	0.028 ±0.001[c]	0.276 ±0.002[b]
96	0.065 ±0.002[a]	0.027 ±0.001[d]	0.277 ±0.002[b]
120	0.061 ±0.002[a]	0.028 ±0.000[c]	0.279 ±0.001[b]
144	0.061 ±0.001[a]	0.027 ±0.001[d]	0.282 ±0.001[b]

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ใบพัด

จากตารางที่ 4.11 จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วงแรกของการเจริญจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีการเจริญลดลงจาก 3.66×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร เป็น 2.16×10^5 CFUต่อมิลลิลิตร และมีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจาก 6.68 เป็น 4.87 ภายใน 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคู่ไปกับปริมาณกลูโคสที่ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน จนมีค่าความเข้มข้นเหลือเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร แต่ผลของการเจริญเติบโตของเชื้อไม่สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.84 และในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลงเท่ากับ 1.71×10^6 CFUต่อมิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีน้อย และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชั่วโมงที่ 96 และ 120 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

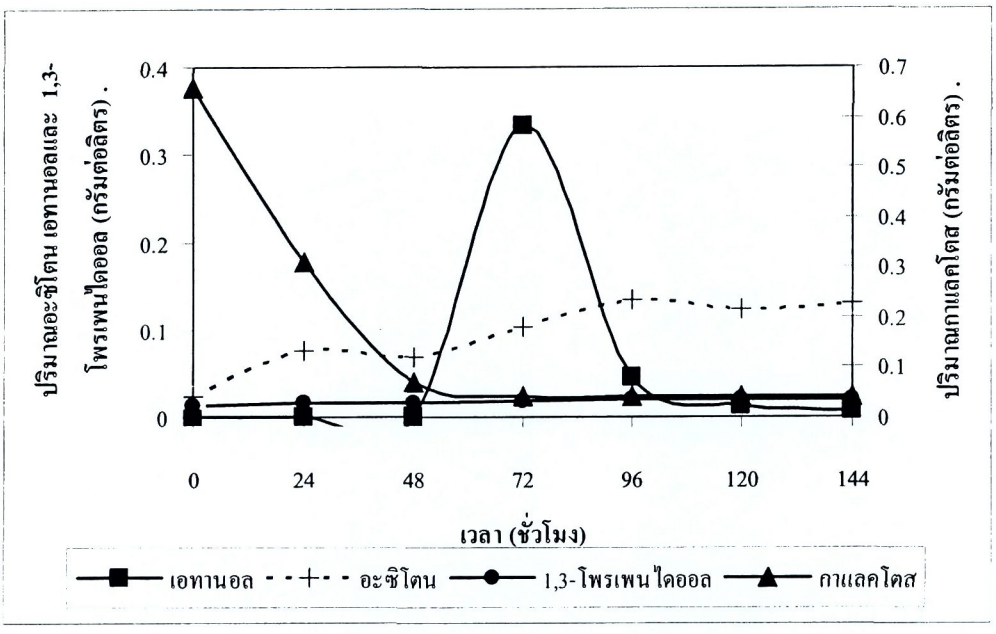
นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จนถึงชั่วโมงที่ 144 เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญขึ้นเล็กน้อยตามปริมาณน้ำตาลที่เหลือ

ตารางที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(3.66\pm5.80\times10^{6})^{b}$	6.267	6.68
24	$(2.16\pm0.67\times10^{6})^{b}$	1.500	4.87
48	$(1.26\pm1.32\times10^{7})^{b}$	0.702	4.82
72	$(2.19\pm0.56\times10^{7})^{ab}$	0.677	4.83
96	$(5.73\pm5.34\times10^{7})^{a}$	0.674	4.84
120	$(1.71\pm0.94\times10^{7})^{ab}$	0.670	4.84
144	$(2.85\pm4.59\times10^{7})^{ab}$	0.668	4.85

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

รายงานการศึกษาของ ลักขณา เหล่าไพบูลย์ (2549) ศึกษาการเจริญของ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในการเลี้ยงแบบกะในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแบบปั่นเหวี่ยงและไม่ปั่นเหวี่ยง พิจารณาค่าความเข้มข้นเซลล์เป็น CFU ต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Pour plate technique พบว่าให้ผลการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานแบบไม่ปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะพีเอช (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอะซิโตน-บิทานอล-เอทานอล พีเอช (pH) 6.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญมากที่สุด



รูปที่ 4.9 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

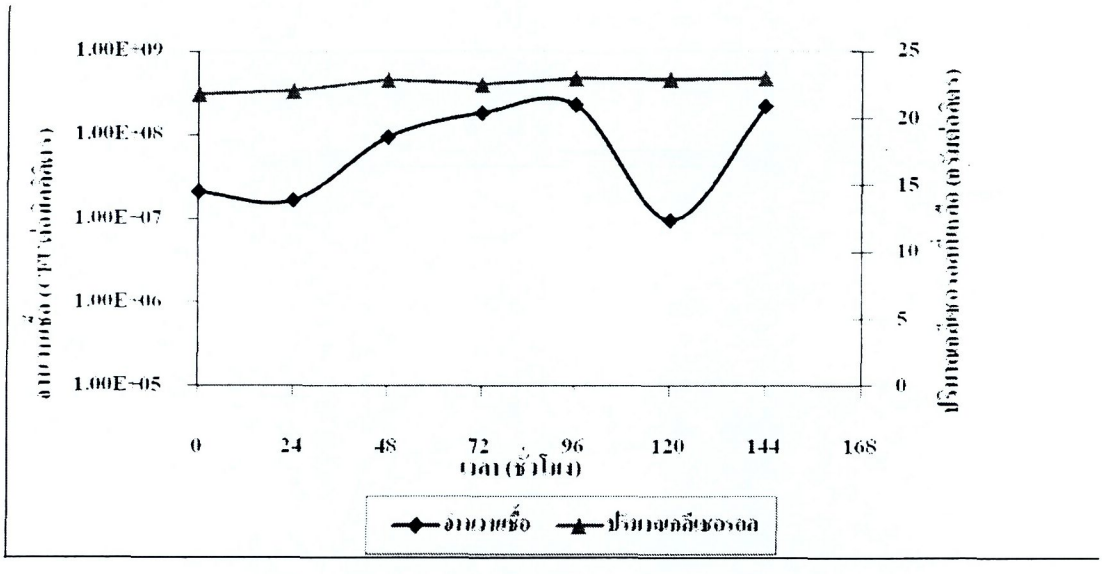
ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ กาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.024 ±0.003 ^{c}	0.013 ±0.001 ^{b}	0.661 ±0.001 ^{a}
24	0	0.076 ±0.047 ^{b}	0.017 ±0.004 ^{a}	0.314 ±0.030 ^{b}
48	0	0.069 ±0.039 ^{b}	0.017 ±0.003 ^{a}	0.074 ±0.070 ^{c}
72	0.333±0.018 ^{a}	0.104 ±0.004 ^{ab}	0.019 ±0.000 ^{a}	0.039 ±0.001 ^{c}
96	0.045 ±0.002 ^{b}	0.134 ±0.011 ^{a}	0.020 ±0.001 ^{a}	0.039 ±0.001 ^{c}
120	0.012 ±0.001 ^{c}	0.123 ±0.002 ^{a}	0.020 ±0.000 ^{a}	0.039 ±0.000 ^{c}
144	0.007 ±0.010 ^{c}	0.130 ±0.009 ^{a}	0.020 ±0.001 ^{a}	0.038 ±0.002 ^{c}

หมายเหตุ a,b,c,d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC ตามรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.12 ไม่พบบิวทานอล แต่พบเอทานอลเข้มข้นประมาณ 0.333 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 72 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลกาแลคโตสที่ลดลงจาก 0.661 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงเริ่มต้นเหลือ 0.039 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 72 เช่นเดียวกัน และพบอะซิโตนเข้มข้นสูงสุด 0.134 กรัมต่อลิตรที่ 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลเฉลี่ยเท่ากับ 0.018 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

จากรายงานของ อังคณา มุขพลอย (2549) ศึกษาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยใช้วิธี Central Composite Design (CCD) พบว่าส่วนประกอบของอาหารที่ดีที่สุดประกอบด้วยกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำคั้นฟางข้าว 70.27 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.03 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก พีเอช (pH) เริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ผลปรากฏว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบบกะในสภาวะไร้อากาศที่ทำให้เชื้อ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ JCM 1419 สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงที่สุด (2.64 กรัมต่อลิตร) คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง



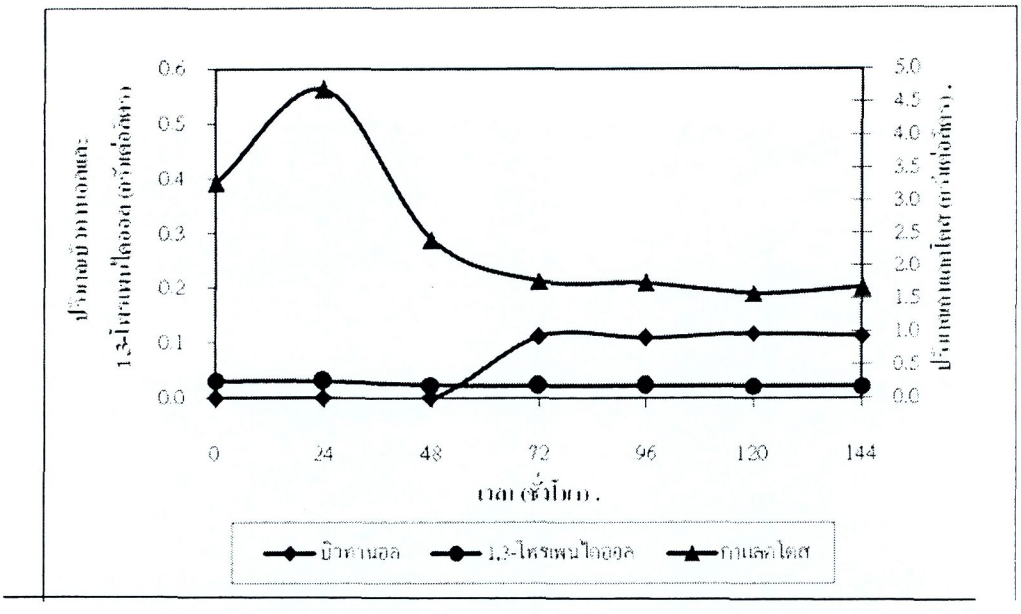
รูปที่ 4.10 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)

ตารางที่ 4.13 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$(2.11\pm0.38\times10^{7})^{c}$	$(21.83\pm0.05)^{d}$	6.68
24	$(1.65\pm0.29\times10^{7})^{c}$	$(22.05\pm0.05)^{c}$	6.44
48	$(9.38\pm8.66\times10^{7})^{bc}$	$(22.88\pm0.17)^{a}$	6.98
72	$(1.83\pm0.95\times10^{8})^{ab}$	$(22.54\pm0.11)^{b}$	6.98
96	$(2.30\pm0.40\times10^{8})^{a}$	$(22.97\pm0.08)^{a}$	6.90
120	$(9.55\pm9.12\times10^{6})^{c}$	$(22.90\pm0.01)^{a}$	6.90
144	$(2.17\pm0.31\times10^{8})^{a}$	$(22.99\pm0.09)^{a}$	6.98

หมายเหตุ a, b,c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารสูตร GYCC พบว่า เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 2.25×10^{8} CFUต่อมิลลิลิตร และเชื้อมีจำนวนคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.13 ส่วนค่าพีเอช (pH) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 4.11 ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด

ตารางที่ 4.14 ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกาแลคโตส (กรัมต่อลิตร)
0	0	0.032 ±0.001 [a]	3.272 ±2.83 [ab]
24	0	0.031 ±0.001 [a]	4.693 ±0.25 [a]
48	0.027 ±0.047 [b]	0.023 ±0.001 [b]	2.407 ±0.30 [b]
72	0.112 ±0.001 [a]	0.022 ±0.000 [c]	1.780 ±0.14 [b]
96	0.1093 ±0.002 [a]	0.022 ±0.001 [c]	1.753 ±0.06 [b]
120	0.1173 ±0.010 [a]	0.021 ±0.001 [a]	1.590 ±0.20 [b]
144	0.1127 ±0.002 [a]	0.022 ±0.001 [a]	1.679 ±0.03 [b]

หมายเหตุ a, b,c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TI STR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการใช้ใบพัดด้วยเครื่อง HPLC เริ่มพบบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยงเข้มข้น 0.027 กรัมต่อลิตรและเพิ่มขึ้นเป็น 0.112 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบเอทานอล และอะซิโตน ซึ่งจำนวนเชื้อที่มีชีวิตและปริมาณบิวทานอลมีแนวโน้มสอดคล้องไปกับการใช้น้ำตาลกาแลคโตส ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 3.272 กรัมต่อลิตรลดลงเป็น 1.753 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังคงพบปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออล เฉลี่ยเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตรตลอดการเพาะเลี้ยง

4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

4.3.1 *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม

ในการทดลองนี้ ต้องการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P 2 ซึ่งเป็นอาหารชุดควบคุมของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 โดยเริ่มการทดลองจากการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่นำมาจากอาหารแข็ง reinforce clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน anaerobic jar ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเชื้อจุ่มในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที นำไปถ่ายลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้สภาวะการเพาะเลี้ยงเป็นแบบไร้ออกซิเจน และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น และเก็บตัวอย่างต่อไปทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลารวม 168 ชั่วโมง

จากนั้น ทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.12

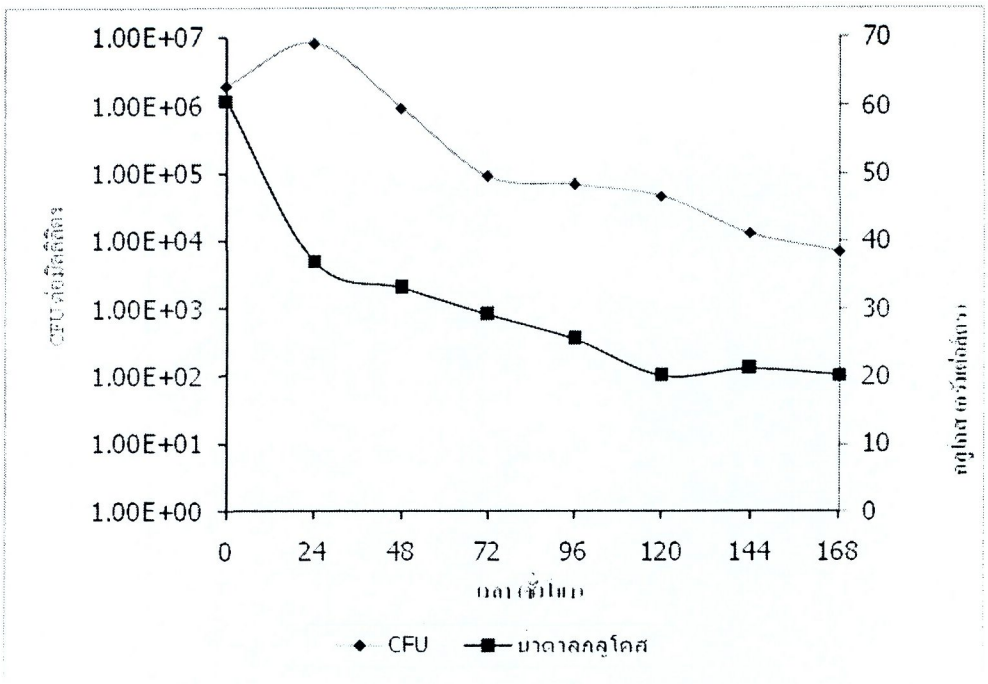
จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.12 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 เริ่มต้นนับได้ 1.96×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 8.38×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น เมื่อเวลาผ่านไปจนจบการเพาะเลี้ยงที่ 168 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงเรื่อยๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท (น้ำตาลกลูโคส) โดยค่าความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 37.09 กรัมต่อลิตร คำนวณเป็นค่าความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ไป 23.69 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144และ168 ชั่วโมง มีการใช้น้ำตาลเพียงเล็กน้อยและเหลือความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ 20.30 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.15 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(1.96 \pm 0.06 \times 10^6)^b$	60.75 ± 0.56^a
24	$(8.38 \pm 0.21 \times 10^6)^a$	37.09 ± 1.26^b
48	$(9.26 \pm 0.21 \times 10^5)^c$	33.16 ± 0.94^c
72	$(9.10 \pm 0.07 \times 10^4)^d$	29.18 ± 0.37^d
96	$(6.90 \pm 0.20 \times 10^4)^d$	25.60 ± 1.12^c
120	$(4.58 \pm 0.07 \times 10^4)^d$	20.68 ± 1.72^f
144	$(1.31 \pm 0.09 \times 10^4)^d$	21.25 ± 0.84^f
168	$(7.10 \pm 0.95 \times 10^3)^d$	20.31 ± 1.13^f

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารอุดม P2

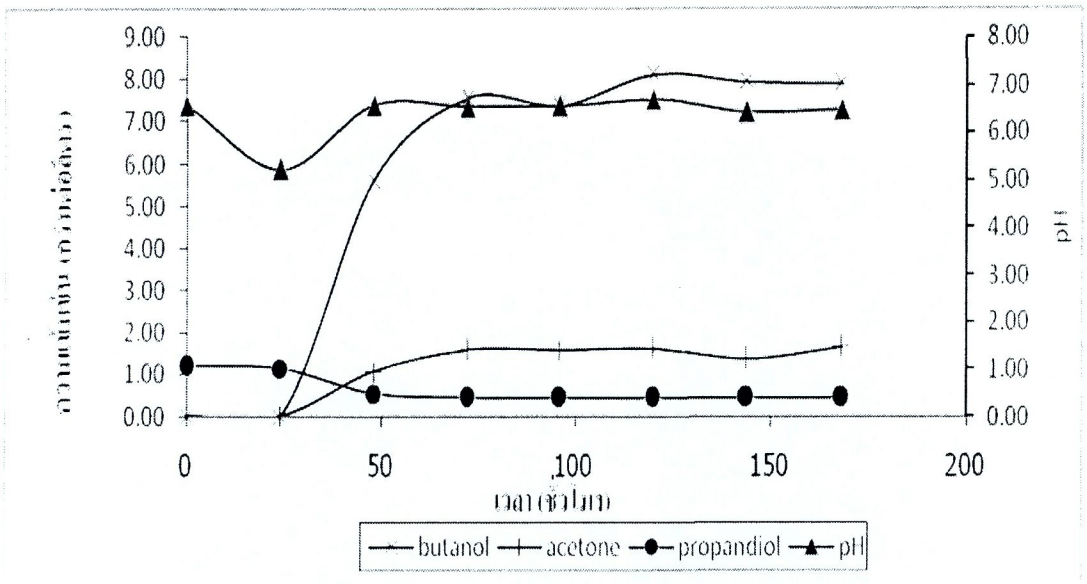
เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.13 ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 120 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 168 และมีการผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลตลอดการเพาะเลี้ยง เนื่องมาจากสารนี้พบได้ในเมตาบอริซึมของแบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดีย (Biebl และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 โดยมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.21 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4.16 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.56	0^{c}	0^{d}	1.21 ± 0.08^{a}
24	5.22	0^{c}	0^{d}	1.14 ± 0.06^{a}
48	6.57	5.61 ± 0.55^{b}	1.07 ± 0.23^{c}	0.55 ± 0.02^{b}
72	6.53	7.55 ± 0.40^{a}	1.59 ± 0.16^{ab}	0.46 ± 0.02^{c}
96	6.56	7.38 ± 0.22^{a}	1.58 ± 0.04^{ab}	0.45 ± 0.01^{c}
120	6.69	8.12 ± 0.65^{a}	1.63 ± 0.09^{a}	0.45 ± 0.01^{c}
144	6.42	7.94 ± 0.63^{a}	1.37 ± 0.13^{b}	0.45 ± 0.01^{c}
168	6.47	7.90 ± 0.32^{a}	1.65 ± 0.15^{a}	0.45 ± 0.02^{c}

หมายเหตุ a, b, c และ d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.13 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—×—) อะซีโตน (—+—) 1,3 โพรเพนไดออล (-●-) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส

เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 ของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเดียวกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นองค์ประกอบดำเนิน วิธีการทดลองแบบเดียวเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกลูโคสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.14

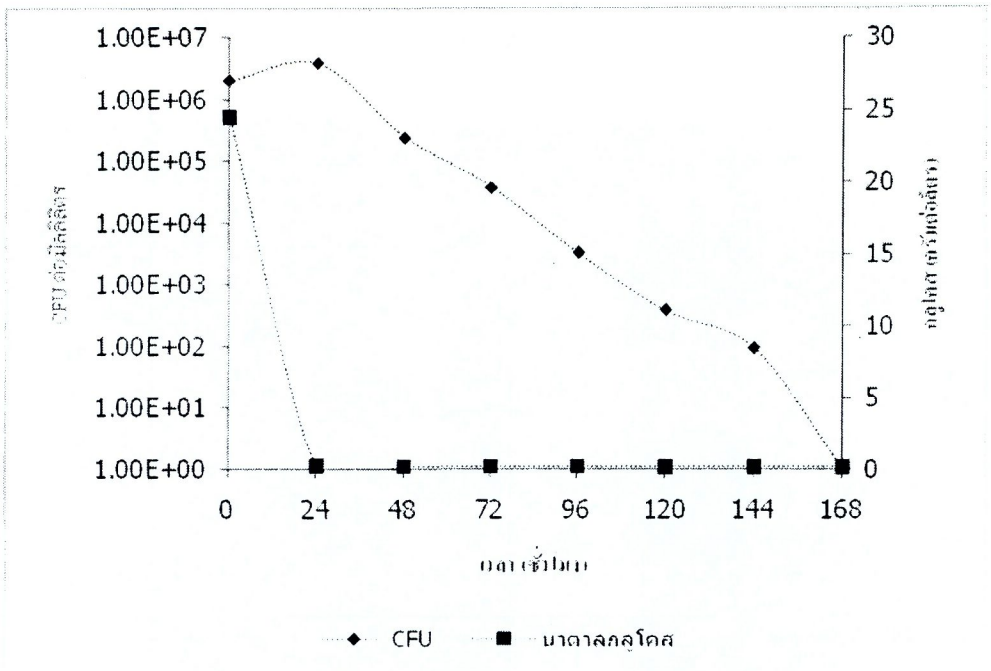
ตารางที่ 4.17 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.07 \pm 0.09 \times 10^{6})^{b}$	24.55 ± 1.21^{a}
24	$(3.93 \pm 0.37 \times 10^{6})^{a}$	0.27 ± 0.02^{b}
48	$(2.45 \pm 0.21 \times 10^{5})^{c}$	0.25 ± 0.00^{b}
72	$(3.82 \pm 0.40 \times 10^{4})^{c}$	0.23 ± 0.00^{b}
96	$(3.31 \pm 0.19 \times 10^{3})^{c}$	0.22 ± 0.00^{b}
120	$(3.90 \pm 0.70 \times 10^{2})^{c}$	0.19 ± 0.00^{b}
144	$(9.33 \pm 2.52 \times 10)^{c}$	0.20 ± 0.00^{b}
168	0^{c}	0.20 ± 0.00^{b}

หมายเหตุ a, b และ c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการทดลองได้ผลการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.14 พบว่าเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.07×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 3.93×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร ต่อมาพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยลดลงอย่างรวดเร็วจนจบการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท หรือน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีการลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคสเฉลี่ยที่ 0.27 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณตามตารางที่ 4.2 แล้วมีเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้ไป 24.27 กรัมต่อลิตร และในเวลา 48, 72, 96, 120, 144และ168 ชั่วโมง แทบไม่เหลือน้ำตาลในระบบเลย



รูปที่ 4.14 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C .beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 ของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 และทำการตรวจวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} และ10^{-5} รายงานในหน่วยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากการนับเชื้อจุลินทรีย์ตามรูปที่ 4.15 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ที่เวลาเริ่มต้นนับได้ 2.09×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมงมีการเจริญเติบโตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดเฉลี่ยที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้น ในเวลา 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 และ360 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อมีการลดจำนวนลง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการใช้สับสเตรท ซึ่งก็

คือกลีเซอรอล ปริมาณกลีเซอรอลลดลงอย่างช้าๆ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยในชั่วโมงสุดท้ายคือชั่วโมงที่ 360 กลีเซอรอลถูกใช้ไปจนหมด

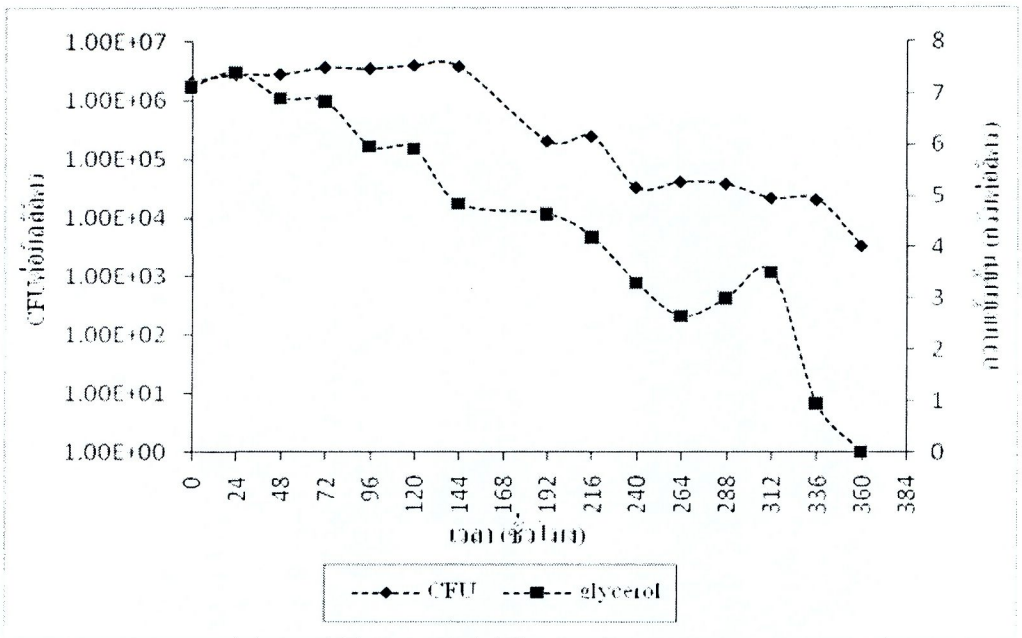
ตารางที่ 4.18 ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (CFU ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลีเซอรอล (กรัมต่อลิตร)
0	$(2.09 \pm 0.12 \times 10^6)^{e}$	7.12 ± 0.11^{ab}
24	$(2.76 \pm 0.14 \times 10^6)^{d}$	7.39 ± 0.31^{a}
48	$(2.80 \pm 0.23 \times 10^6)^{d}$	6.90 ± 0.71^{ab}
72	$(3.67 \pm 0.55 \times 10^6)^{bc}$	6.84 ± 0.46^{abc}
96	$(3.51 \pm 0.10 \times 10^6)^{c}$	5.97 ± 0.13^{abc}
120	$(3.97 \pm 0.05 \times 10^6)^{b}$	5.92 ± 0.08^{abcd}
144	$(3.77 \pm 0.24 \times 10^6)^{bc}$	4.85 ± 0.72^{abcd}
168	$(4.78 \pm 0.26 \times 10^6)^{a}$	nd
192	$(2.04 \pm 0.06 \times 10^5)^{f}$	4.64 ± 0.41^{abc}
216	$(2.43 \pm 0.51 \times 10^5)^{f}$	4.188 ± 0.87^{bcd}
240	$(3.25 \pm 0.26 \times 10^4)^{f}$	3.29 ± 0.31^{cde}
264	$(4.08 \pm 0.07 \times 10^4)^{f}$	2.64 ± 0.35^{cde}
288	$(3.73 \pm 0.34 \times 10^4)^{f}$	3.00 ± 0.97^{cde}
312	$(2.15 \pm 0.21 \times 10^4)^{f}$	3.51 ± 0.86^{f}
336	$(2.03 \pm 0.05 \times 10^4)^{f}$	0.94 ± 0.62^{ef}
360	$(3.24 \pm 0.24 \times 10^3)^{f}$	0^{f}

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

nd หมายถึง ค่าที่ได้จากการทดลองเกิดการผิดพลาด



รูปที่ 4.15 การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (--◆--) และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ C .*beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร

เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15) เมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงผ่านไป จำนวนเซลล์ก็จะมีปริมาณมากขึ้น และมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 168 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 4.78×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตสูงสุดจากกลูโคสที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งนับได้ 3.93×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วที่ 24 ชั่วโมงและค่อยๆ ลดจำนวนลง อันน่าจะเป็นผลมาจากความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเชื้อจุลินทรีย์ตัวนี้

มีรายงานผลกระทบของความเข้มข้นของสารอาหารในการควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามรายงานของ Maddox (1995) กล่าวว่า การจำกัดสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักแบบกะ จะทำให้การเจริญของเซลล์ถูกจำกัดเพราะเกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญไปแม้ว่าจะทราบความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น แต่ก็ไม่ทราบความเข้มข้นของสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักและหลังจากกระบวนการหมัก

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อ

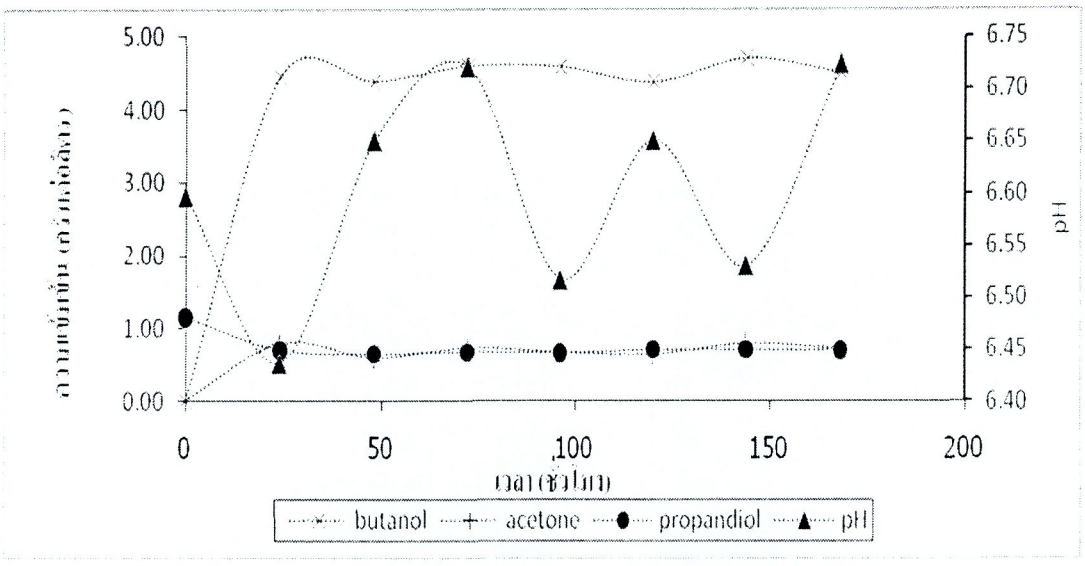
ลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.19 กับ 4.20 และรูปที่ 4.16 กับ 4.17 ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *C. beijerinckii* สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.15 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้อาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 และมีปริมาณ 1,3-โพรเพนไดออลสูงสุด 1.57 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 2 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.19 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3-โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.53	0^{b}	0^{c}	1.15 ± 0.03^{a}
24	6.44	4.45 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.11^{a}	0.70 ± 0.03^{bc}
48	6.65	4.39 ± 0.23^{a}	0.59 ± 0.18^{b}	0.65 ± 0.01^{d}
72	6.72	4.60 ± 0.11^{a}	0.73 ± 0.04^{ab}	0.67 ± 0.02^{bcd}
96	6.52	4.59 ± 0.25^{a}	$0.67 \pm 0.08^{a b}$	0.66 ± 0.02^{cd}
120	6.65	4.37 ± 0.14^{a}	0.64 ± 0.07^{ab}	0.71 ± 0.01^{b}
144	6.53	4.70 ± 0.20^{a}	0.79 ± 0.09^{a}	0.71 ± 0.02^{b}
168	6.72	4.50 ± 0.22^{a}	0.72 ± 0.05^{ab}	0.70 ± 0.01^{bc}

หมายเหตุ a, b และ cในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.16 ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (×) อะซีโตน (+) 1,3โพรเพนนอล (●) และค่าความเป็นกรดด่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 4.20 ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

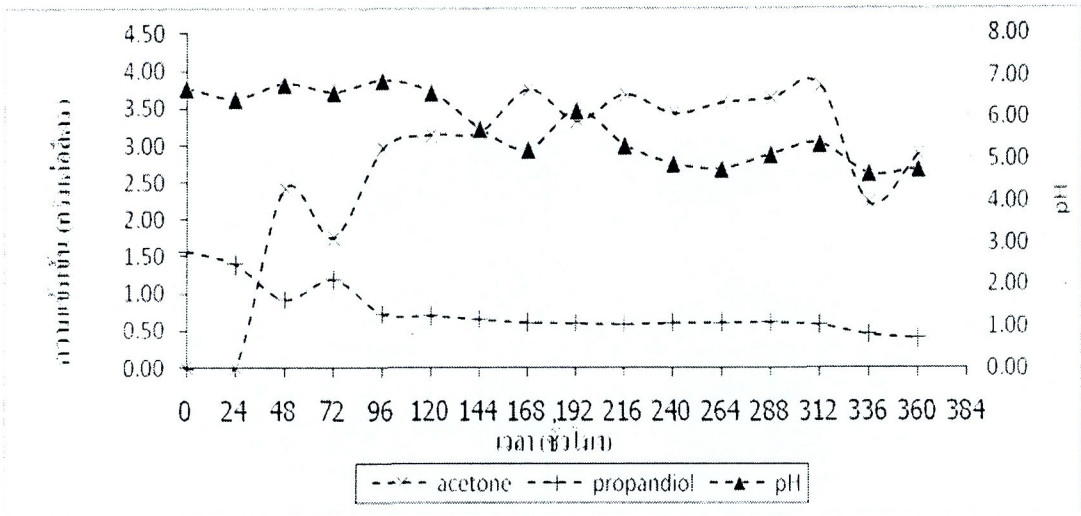
เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
0	6.70	0^{c}	1.57 ± 0.01^{a}
24	6.44	0^{c}	1.39 ± 0.01^{b}
48	6.80	2.41 ± 0.16^{bcd}	0.92 ± 0.08^{d}
72	6.60	1.75 ± 0.06^{d}	1.19 ± 0.02^{c}
96	6.88	2.94 ± 0.13^{abc}	0.73 ± 0.02^{c}

ตารางที่ 4.20 (ต่อ) ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง

เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)	pH	ปริมาณอะซีโตน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ1,3โพรเพนไดออล (กรัมต่อลิตร)
120	6.60	3.13 ± 0.14^{abc}	0.70 ± 0.05^{e}
144	5.72	3.17 ± 0.15^{abc}	0.65 ± 0.03^{ef}
168	5.22	3.74 ± 0.32^{a}	0.61 ± 0.04^{f}
192	6.66	3.32 ± 0.30^{ab}	0.60 ± 0.01^{f}
216	5.33	3.68 ± 0.25^{a}	0.59 ± 0.01^{f}
240	4.89	3.42 ± 0.27^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
264	4.77	3.57 ± 0.28^{a}	0.61 ± 0.03^{f}
288	5.10	3.63 ± 0.13^{a}	0.62 ± 0.02^{f}
312	5.36	3.80 ± 0.38^{a}	0.58 ± 0.04^{f}
336	4.65	2.21 ± 0.97^{cd}	0.45 ± 0.14^{g}
360	4.77	2.86 ± 0.09^{abc}	0.40 ± 0.01^{g}

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f และ gในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4.17 ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (-×-) 1,3โพรเพนไดออล (-+-) และค่าความเป็นกรดด่าง (-▲-) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากรายงานของ Fermanek และคณะ (1997) พบว่าระดับของบิวทานอลและอะซิโตนที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ได้ผลของบิวทานอลและตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้นด้วย โดย *C. beijerinckii* BA101 และ NCIMB 8052 สายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญใน อาหารเลี้ยงเชื้อP2 กึ่งแข็ง ที่ประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ของมอลโตเดร็กส์ติน (maltodextrin) หรือกลูโคสในกระบวนการหมักแบบกะ 20 ลิตร *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 19 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Qureshi และคณะ(2008) พบว่าเมื่อเติมกลูโคสปริมาณ 58.8 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* P260 จะสามารถผลิตอะซีโตนได้ 5.44 กรัมต่อลิตร บิวทานอลเป็น 15.21 กรัมต่อลิตร และเอทานอลเป็น 0.41 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการหมักกลูโคสจะถูกใช้ไป 51.4 กรัมต่อลิตร ภายหลังปริมาณกลูโคสจะเหลือเท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร