บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลวิจัย

5.1.1 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในสูตรอาหารที่ 1

จากการศึกษาความสามารถในการหมักโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคส ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 120 ที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดจากนั้นจึงเริ่มลดลง มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 1.33×10^{8} CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดลองในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน โดยพบ 2.67×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการศึกษาโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462

โดยจะทำการศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอล 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง คือ 4.80×10^{9} CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบแต่เมทานอลซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการหมักให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น (Maintinguer และคณะ , 2008)และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ พบซอร์บิ-ทอลซึ่งมีค่าคงที่ประมาณ 0.53 กรัมต่อลิตรในตัวอย่าง ซึ่งน่าจะเป็นสารปนเปื้อนในกลูโคส เพราะ จุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลเป็นแหล่งอาหารได้

5.1.2 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในสูตรอาหารที่ 2

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อโดยการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYCC ในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เชื้อมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ 1.20×10^{7}

CFUต่อมิลลิลิตร แปรผันกันกับปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลือเท่ากับ 8.10 กรัมต่อลิตร และการทดลองที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณเชื้อสูงสุดเท่ากับ 3.47×10^7 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณกลีเซอรอลแปรผกผันกับจำนวนเซลล์ โดยการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ใช้ปริมาณ กลีเซอรอลไป 1.45 กรัมต่อลิตร จากชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 8.52 กรัมต่อลิตร ลดลงเหลือ 7.07 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลีเซอรอล เพราะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณบิวทานอลด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตบิวทานอลได้

การศึกษากระบวนการหมักและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้กลูโคสและ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน การเลี้ยงเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีจำนวนลดลงจากชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเชื้อ 7.57×10^5 CFUต่อมิลลิลิตรเป็น 1.16×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร อาจเนื่องมาจากเชื้อต้องมีการปรับตัวจาก Innoculumn สู่สภาวะในถังหมักเชื้อจึงมีจำนวนลดลง จากนั้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงผ่านไปเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 8.03 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อและบ่งชี้ได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างสารผลิตภัณฑ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการสร้าง 1,3-โพรเพนไดออล และเอทานอล ในชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.180 และ 0.031 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั่น การเจริญของเชื้อมีลักษณะคล้ายกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ผลิตได้เท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรและผลิตโพรเพนไดออลในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.029 กรัมต่อลิตร

การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง การเจริญเติบโตของเชื้อจากชั่วโมงที่ 0 เข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 มีการเจริญเติบโตลดลงซึ่งขัดแย้งกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 96 จำนวนเชื้อมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 5.73×10^7 CFUต่อมิลลิลิตรและในชั่วโมงที่ 120 เชื้อมีปริมาณลดลง เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตบิวทานอลแต่มีการผลิต อะซิโตนในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรและเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ปริมาณเท่ากับ 0.333 กรัมต่อลิตร ปริมาณของเอทานอลลดลงเนื่องจากแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อมี

ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 2.25 $\times 10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เชื้อมีการผลิตบิวทานอลในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับ 0.027 กรัมต่อลิตร และผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 120 ปริมาณเท่ากับ 0.117 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังผลิต 1,3-โพรเพนไดออล ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณที่ผลิตได้ คือ 0.025 กรัมต่อลิตร

5.1.3 สรุปผลวิจัยของจีนัส *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390

จากการศึกษาความสามารถในการหมักโดยเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้กลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 พบว่าที่ชั่วโมง 24 มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดจากนั้นจึงเริ่มลดลง โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.33 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนในการทดลองการเปรียบเทียบในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรกับการใช้กลีเซอรอลเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหาร พบว่าในชุดควบคุมซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหาร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.93 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งอาหารพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่สูงสุดที่ 168 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.78 x 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ บิวทานอล อะซีโตน และเอทานอล โดยพบว่า เมื่อเติมกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิต บิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย มีข้อเสนอแนะในการทดลองดังต่อไปนี้

1. การทำวิจัยที่เป็นการทดลองในระดับฟลาสก์อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้มาก เนื่องจากควบคุมสภาวะภายในได้ยาก จึงควรที่จะทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักมากกว่า
2. ทำการศึกษาเชื้อ *Clostridium* สายพันธุ์อื่น เนื่องจากในงานวิจัยนี้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณที่น้อย
3. ควรเพิ่มระดับการทดลองลงในถังหมักเพื่อการควบคุมสภาวะที่ดีขึ้น