ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250373

รายงานการวิจัย

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Biological Production of Butanol from Glycerol

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250373

รายงานการวิจัย

การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Biological Production of Butanol from Glycerol

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ" ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อรายงานผลการวิจัยแก่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้กรุณาให้เงินทุนอุดหนุนการวิจัย ในประเภทเงินงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2553 ทำให้เกิดทีมงานวิจัยอันประกอบด้วยคณาจารย์และนักศึกษาในสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสามารถดำเนินงานวิจัยลุล่วงไปได้ นอกจากนี้ยังต้องขอขอบคุณ ผศ.ดร. นพพล เล็กสวัสดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์หาสารต่างๆ โดยใช้เครื่อง HPLC พร้อมทั้งวิเคราะห์ผลให้เกิดความถูกต้องยิ่งขึ้น อนึ่งหากมีข้อผิดพลาดประการใดในรายงานฉบับนี้ ทางคณะผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงงาน	การผลิตบิวทานอลจากกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนด้วยกระบวนการทางชีวภาพ
Research title	Biological Production of Butanol from Glycerol
แหล่งเงิน	เงินวิจัยงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ	2553 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หน่วยงาน	สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โทร. 087-698-5528 email: vorapats@hotmail.com
คำสำคัญ	บิวทานอล, กลีเซอรอล, *Clostridium beijericnkii*, *Clostridium acetobutyricum*, การหมักในสภาวะไร้อากาศ

บทคัดย่อ

250373

ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และ *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 ทดแทนกลูโคสเพื่อการผลิตบิวทานอล ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนได้ นอกจากเอาไปใช้เป็นตัวทำละลายแล้ว ยังสามารถใช้แทนดีเซลและคีโรซีน แล้วเอาไปทำเป็นสารรักษาอาหารสัตว์ สารฆ่าเชื้อ และสาร C4 ในอุตสาหกรรมเคมี

สำหรับเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ที่นำมาทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะไร้อากาศในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง และทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร) เมื่อทำการศึกษาการเจริญเติบโตจะพบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีจำนวนเซลล์มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 120 พบเป็นจำนวน 1.33×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่จะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 40 กรัมต่อลิตร

250373

โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ 4.80 $\times 10^9$ CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC ไม่พบสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล พบแต่เมทานอลซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการหมักให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน จากการใช้กลีเซอรอลเป็นสารตั้งต้น

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ *C lostridium acetobutylicum* TISTR 1462 เป็นสูตร GYCC และทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ตั้งนิ่งขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะไร้อากาศ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะไร้อากาศ โดยไม่ใช้ใบพัด และใช้ใบพัดความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ กลูโคสและกลีเซอรอล พบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักที่ไม่มีการใช้ใบพัด โดยมีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.24 $\times 10^9$ CFU ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ของกระบวนการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างลดลงจาก 6.76 เป็น 5.98 หลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 72 ชั่วโมง จากนั้น ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 6.04-6.06 จนจบการเพาะเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงสภาวะเดียวกันนี้ ยังพบบิวทานอล 0.063 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงด้วย แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2 ลิตรพร้อมกับใช้ใบพัดความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบบิวทานอลความเข้มข้นสูงถึง 0.117 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และจำนวนเซลล์สูงสุด 2.30 $\times 10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ที่ 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักทั้งหมดยังพบสาร 1,3-โพรเพนไดออลในปริมาณเล็กน้อยอีกด้วย

ส่วนเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 ในระดับฟลาสก์ตั้งนิ่งขนาด 250 มิลลิลิตรในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตด้วยการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต พบว่าเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนเซลล์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวน 8.38 $\times 10^6$CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับการเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว พบว่าการใช้กลูโคสมีจำนวนเซลล์มากที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 24 เป็นจำนวน 3.93 $\times 10^6$CFU ต่อมิลลิลิตร และการใช้กลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร พบจำนวนเซลล์มากที่สุด ในชั่วโมงที่ 168 เป็นจำนวน 4.78 $\times 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำส่วนใสของตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก คือ อะซีโตน บิวทานอล และเอทานอล พบว่า เมื่อเติมกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอล

250373

ได้สูงสุด 8.11 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 120 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 1.65 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 168 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด 4.70 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 144 และสามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 0.7927 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 144 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเติมกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตอะซีโตนได้สูงสุด 3.7961 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมง 312 แต่ไม่พบการผลิตบิวทานอล และทั้ง 3 การทดลองไม่พบการสร้างเอทานอลในกระบวนการหมัก

Research title Biological Production of Butanol from Glycerol

Scholarships Thai Budget for Research

Fiscal Year 2009 **Research budget** 200,000 Baht

Research period One year from 1st October 2009 to 30th September 2010

Researcher Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph. D.

Office Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Tel. 087-698-5528 Email: vorapats@hotmail.com

Keywords butanol, glycerol, *Clostridium beijericnkii*, *Clostridium acetobutyricum*, anaerobic cultivation

ABSTRACT

250373

According to the crisis of the petroleum's current price, the importance of the renewable energy has been increasing, especially the production of biodiesel in form of methylester produced by using chemical transesterification processes. One of these processes' by-products was 10% glycerol, which has been increased with the growing trend of biodiesel production. However, by-product, such as glycerol, could be transformed to higher valued products and reduced the cost of by-product elimination. There have been several reports to use glycerol as a substrate for the production of butanol by biotechnology process. Hence, this study was interested to cultivate *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 and *Clostridium beijericnkii* TISR 1390 in glycerol for the production of butanol, which could be renewable energy, industrial solvent and feed additives.

When using *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462, the fermentation studies were conducted in shake-flasks with anaerobic conditions in the medium at 200 rpm and 30 °C. Sampling was carried out every 24 hours. The maximum growth of microorganisms (1.33×10^8 CFU/mL) was found at 120 hours of cultivation. Furthermore, in order to study appropriate glycerol amount for growth, the varied concentrations of glycerol (10, 20, 30, 40 and 50 g/L)

250373

were added in the medium. The study was found that microbial cells were maximized when the concentration of glycerol was 40 g/L. After cultivation of 144 hours, the maximum cell number was 4.80 x 10^9 CFU/mL. Then, the sampling's supernatants were analyzed for the amount of substances occurred during fermentation by HPLC. The result suggested that no main substance, which should be generated during the fermentation process, acetone, buthanol and ethanol, was discovered. However, methanol, one of the intermediates in the hydrogen metabolism was obtained in the sampling gained from the addition of glycerol as substrate in the medium.

After medium alteration to GYCC, however, *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 was cultivated in media containing glucose and glycerol as carbon sources in 250-mL flasks, 2-L fermenter with and without agitation. The maximum amount of cells (2.24 10^9 CFU/mL) was given in GYCC medium containing glycerol in 2-L bioreactor without agitation at 120 hours. The pH of the medium decreased from 6.76 to 5.98 after 72 hours of cultivation and increased to 6.04-6.06 until the end of the cultivation (144 hours). Moreover, the butanol concentration of 0.063 g/L was found since 24 hours of the cultivation in the same condition. Furthermore, while *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 was cultivated in GYCC medium containing glycerol in 2-L bioreactor with 200-rpm agitation, the butanol concentration of 0.117 g/L and the maximum amount of cells of 2.30×10^8 CFU/mL were obtained at 120 and 96 hours, respectively. In addition, little amount of 1,3-propanediol was discovered in all 2-L bioreactor cultivations.

Clostridium beijerienkii TISR 1390 was cultivated for the production of buthanol. Glycerol was by-product from transesterification (biodiesel process). The fermentation investigations were conducted in 250-ml flasks with anaerobic condition at 37 ^{o}C. Sampling was carried out every 24 hours for chemicals analysis and viable cell plate count. The addition of 60 g/l glucose to the medium was resulted the maximum growth of 8.33 x10^6 CFU/ml at 24 hours of the cultivation, while the maximum growth of microorganism (3.93 x10^6 CFU/ml) was presented at 24 hours with the addition of 20 g/l glucose. The addition of 20 g/l glycerol provided 4.78 x10^6 CFU/ml at 168 hours. Subsequently, the supernatants of the samples were analyzed for the amount of substances occurred during fermentation by HPLC. The maximum concentration of butanol (8.11 g/l) was found in 120 hour and acetone concentration of 1.65 g/l was found in 168 hour sample with the addition of 60 g/l glucose. The addition of 20 g/l glucose gave the

250373

maximum buthanol level of 4.70 g/l and acetone concentration of 0.793 g/l at 144 hours. The addition of 20 g/l glycerol gave the maximum butanol level of 3.796 g/l and acetone couldn't be discovered in the samples from the fermentation. However, ethanol couldn't be obtained in the samples from the fermentation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	V
สารบัญ	VIII
สารบัญตาราง	XII
สารบัญรูป	XIX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 บิวทานอล (Butanol)	5
2.1.1 ประวัติของบิวทานอล	5
2.1.2 ประโยชน์ของบิวทานอล	6
2.1.3 คุณสมบัติของบิวทานอล	6
2.1.4 กระบวนการผลิตบิวทานอล	10
2.2 กลูโคส (Glucose)	11
2.2.1 แหล่งที่มา	11
2.2.2 คุณสมบัติของกลูโคส	12
2.2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อการใช้กลูโคสในการผลิตบิวทานอล	14
2.3 กลีเซอรอล (Glycerol)	14
2.3.1 ประวัติของกลีเซอรอล	14
2.3.2 ประโยชน์ของกลีเซอรอล	15
2.3.3 คุณสมบัติของกลีเซอรอล	15
2.3.4 การสังเคราะห์กลีเซอรอล	18
2.3.5 การหมักกลีเซอรอล	18

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.4.6 เมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล	25
2.4	กระบวนการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล	30
	2.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก	30
	2.4.2 กระบวนการทางชีวเคมีของการหมัก	32
	2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก	33
2.5	สัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	36
	2.5.1 *Clostridium acetobutylicum*	37
	2.5.2 *Clostridium beijerinckii*	38
2.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตบิวทานอล	39
บทที่ 3	**อุปกรณ์และวิธีการทดลอง**	47
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	
	3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*	47
	3.1.2 *Clostridium beijerinckii*	47
3.2	สารเคมี	47
3.3	อุปกรณ์	47
3.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ	48
	3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial	48
	3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*สูตรที่ 1	49
	3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*สูตรที่ 2	49
	3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	50
3.5	การเพาะเลี้ยงเชื้อ	51
	3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*	51
	3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	51
3.6	กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ	52
	3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 1	52
	3.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในระดับฟลาสก์	52

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.6.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ไม่ใช้ใบพัด	52
3.6.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารสูตรที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ใบพัด	53
3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*	53
3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง	53
3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์	53
3.7.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	54
3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ	54
3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	55
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 1	56
4.1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	56
4.1.2 การหาความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์	61
4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารสูตรที่ 2	64
4.2.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในฟลาสก์	64
4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ไม่ใช้ใบพัด	68
4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ใบพัด	74

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390	80
4.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ชุดควบคุม	80
4.3.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเปรียบเทียบกับกลูโคส	84
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	93
เอกสารอ้างอิง	97
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกราฟมาตรฐาน	106
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ	116

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพของบิวทานอล	7
2.2	ชื่อเรียกและสูตรโมเลกุลของบิวทานอล	7
2.3	คุณสมบัติทางพลังงานของน้ำมันแก๊สโซลีน บิวทานอล เอทานอล และเมทานอล	9
2.4	คุณสมบัติทางเคมีของกลูโคส	13
2.5	การใช้ประโยชน์จากกลีเซอรอล	16
2.6	คุณสมบัติทางกายภาพของกลีเซอรอล	17
2.7	คุณสมบัติทางเคมีของกลีเซอรอล	18
2.8	มาตรฐานของสารกลีเซอรอลตามอุตสาหกรรมที่มีการนำไปใช้	19
2.9	รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกลีเซอรอล	24
4.1	ผลของการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	58
4.2	ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	59
4.3	ปริมาณเมทานอลที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ	61
4.4	ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum*เมื่อเวลาผ่านไป	62
4.5	ผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของกลีเซอรอลที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยง	62
4.6	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	65

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	67
4.8	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	69
4.9	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ไม่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	72
4.10	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบไม่ใช้ใบพัด และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	74
4.11	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลูโคสตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	75
4.12	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	76
4.13	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ และความเข้มข้นของกลีเซอรอลตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.14	ปริมาณสารที่เกิดขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปของการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1426 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้ใบพัด และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	79
4.15	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	81
4.16	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	83
4.17	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	85
4.18	ผลของการศึกษาการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแสดงเป็นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	87
4.19	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	89
4.20	ผลของการศึกษาการผลิตสารผลิตภัณฑ์หลักที่ควรเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ในอาหาร P2 โดยแสดงปริมาณที่ผลิตได้ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง	90
ก.1	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์	106
ก.2	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร	107

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.1	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอล	116
ข.2	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลูโคส	119
ข.3	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร	121
ข.4	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร	123
ข.5	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร	125
ข.6	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีส่วนประกอบของกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร	127
ข.7	การวิเคราะห์ทางสถิติ การเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	129
ข.8	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	131
ข.9	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	133
ข.10	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	135
ข.11	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	137

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.12	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	139
ข.13	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง	141
ข.14	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	143
ข.15	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกลีเซอรอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	145
ข.16	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	147
ข.17	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของอะซิโตน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	149
ข.18	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	151
ข.19	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของบิวทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	153
ข.20	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	155
ข.21	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของเอทานอล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	157
ข.22	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	159
ข.23	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	161

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.24	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	163
ข.25	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของ 1,3-โพรเพนไดออล ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	165
ข.26	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	167
ข.27	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	169
ข.28	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	171
ข.29	การวิเคราะห์ทางสถิติความเข้มข้นของกาแลคโตส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัดอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที	173
ข.30	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	175
ข.31	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหารP2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	177
ข.32	การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหารP2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	179
ข.33	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	182
ข.34	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลูโคสที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	184
ข.35	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือตามเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	186
ข.36	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 13900 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	188

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข.37	การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณบิวทานอลและอะซีโตนที่ผลิตได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinkii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	191

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอลที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *Clostridium berjerinckii*	2
2.1	โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล	5
2.2	Octane rating ของน้ำมันเบนซินธรรมดาเมื่อผสมบิวทานอลลงไปในอัตราส่วนต่างกัน	9
2.3	การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก	11
2.4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกลูโคส	13
2.5	สมการแยกสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำในสภาวะกรด	15
2.6	สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล	18
2.7	เมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่สร้างกลีเซอรอล	25
2.8	ภาพการหมักกลีเซอรอลที่ส่วนหนึ่งเป็นการสร้าง 1,3-PDO	27
2.9	วิถีสำหรับการเจริญและการผลิต DHA โดย *C. oxydans* ในกลีเซอรอล membrane-bound glycerol dehydrogenase นำไปสู่การผลิตนอกเซลล์ของ DHA และใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับสุดท้ายของอิเล็กตรอนและมีค่าเท่ากับการรีดิวซ์โดยค่าเฉลี่ยของ Ubiquinone และ Cytochrome O ส่วน DHA-P ถูกกระตุ้นโดยค่าเฉลี่ยของวิถี pentose-phosphate	28
2.10	ภาพรวมของผลพลอยได้ที่อาจได้ในการใช้จุลินทรีย์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล	29
2.11	ลักษณะของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ระหว่างการหมักในอาหารอุดม (P2 medium) เมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า	31
2.12	ลักษณะสปอร์ของ *C. beijerinckii* JCM 1390 ซึ่งถูกเก็บไว้ในน้ำกลั่นเมื่อส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า	31

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
2.13	วิถีการสร้างอะซีโตน บิวทานอล เอทานอล ของ *C. acetobutylicum* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ดังนี้: HYDA แทนไฮโดรจีเนส (hydrogenase) PTA แทนฟอสโฟทรานสอะซีทีเลส(phosphotransacetylase) AK แทนอะซีเตทไคเนส (acetate kinase) THL แทนไทโอเลส (thiolase) CoAT แทนอะซีโตอะซีติล-โคเอ:อะซีเตต- บิวทิเรต:โคเอทรานสเฟอเรส (acetoacetyl-COA:acetate-butyrate:CoA transferase) AADC แทนอะซีโตอะซิเตท ดีคาร์บอกซิเลส (acetoacetate decarboxylase) BHBD แทนเบต้า-ไฮดรอกซีบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (β-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase) CRO แทนโครโทเนส (crotonase) BCD แทนบิวทิริว-โคเอ ดีไฮโดรจีเนส (butyryl-CoA dehydrogenase) PTB แทนฟอสโฟทรานสบิวทิเรส (phosphotransbutylase) BK แทนบิวทิเรท ไคเนส(butyrate kinase) AAD แทนอัลดีไฮด์/แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde/ alcohol dehydrogenase) BDHA&BDHB แทนบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนส เอ และบิวทานอล ดีไฮโดรจีเนสบี (butanol dehydrogenase A & butanol dehydrogenase B)	34
2.14	ภาพของ *Clostridium acetobutylicum*	37
2.15	ลักษณะของ *Clostridium beijerinckii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน	38
2.16	วัฏจักรของกระบวนการสลายกลูโคสของ *Clostridium acetobutylicum* เส้นทึบและเส้นประแสดงถึงปฏิกิริยาตอบสนองภายในเซลล์ และกระบวนการขนถ่ายตามลำดับจำนวนของปฏิกิริยาจะแสดงในวงเล็บ เอนไซม์จะแสดงโดยเลข EC	41
4.1	ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณแหล่งอาหารที่เหลืออยู่ตามเวลาที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยง (ก) ในอาหารชุดควบคุมที่มีกลูโคสและ (ข) ในอาหารที่มีกลีเซอรอล เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ	57
4.2	ผลของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* สูงสุด ที่ 120 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร และที่ 144 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น 10, 20 และ 40 กรัมต่อลิตร	63

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.3	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)	65
4.4	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สภาวะนิ่ง (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	66
4.5	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 และปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ■ ปริมาณกลูโคส)	69
4.6	วิถีชีวเคมีของการหมักกลีเซอรอลไปเป็นสาร 1,3-โพรเพนไดออล และไพรูเวต ซึ่งการใช้ไพรูเวตจะแตกต่างไปตามชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกลุ่มคลอสทิเดียสร้างบิวทิเรตและบิวทานอล ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียผลิต 2,3-บิวเทนไดออลด้วย ส่วนอะซิเตตหรืออะซิโตนกับเอทานอลถูกสร้างในแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม	71
4.7	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	72
4.8	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบไม่ใช้ใบพัด	73
4.9	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	76

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* และปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด (◆ จำนวนเซลล์ ▲ ปริมาณกลีเซอรอล)	77
4.11	ปริมาณสารอื่นที่พบในกระบวนหมักเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบใช้ใบพัด	79
4.12	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (—■—) ในอาหารอุดม P2	82
4.13	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (—·—) อะซีโตน (—+—) 1,3-โพรเพนไดออล (—●—) และค่าความเป็นกรดด่าง (—▲—) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	84
4.14	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (◆) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อ *C .beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร	86
4.15	การเจริญเติบโตตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 วัดจากโคโลนีที่เกิดในจานเพาะเลี้ยง (CFU ต่อมิลลิลิตร) (- - ◆ - -) และการใช้กลีเซอรอลของเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 (■) ในอาหารกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตร	88
4.16	ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอล (×) อะซีโตน (+) 1,3-โพรเพนนอล (●) และค่าความเป็นกรดด่าง (▲) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว	90

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.17	ปริมาณความเข้มข้นของอะซีโตน (-·×·-) 1,3โพรเพนไดออล (-·+·-) และค่าความเป็นกรดด่าง (-·▲·-) ตามช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C beijerinckii* TISTR 1390 ในอาหาร P2 ที่มีกลีเซอรอล 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	92
ก.1	กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการเพาะเลี้ยงแบบฟลาสก์	107
ก.2	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium acetobutylicum* ในการเพาะเลี้ยงแบบถังหมักขนาด 2 ลิตร	108
ก.3	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสด้วยวิธี DNS สำหรับ *Clostridium beijerinckii*	108
ก.4	กราฟมาตรฐานของ 1,3-propanediol ด้วยเครื่อง HPLC	109
ก.5	กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	109
ก.6	กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	110
ก.7	กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	110
ก.8	กราฟมาตรฐานของกรดโพรพาโอนิคจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	111
ก.9	กราฟมาตรฐานของเมทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	111
ก.10	กราฟมาตรฐานของบิวทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	112
ก.11	กราฟมาตรฐานของอะซิโตนจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	112
ก.12	กราฟมาตรฐานของซอร์บิทอลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	113
ก.13	โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของ (ก) บิวทานอลมาตรฐาน (ข) ตัวอย่างที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 ด้วยกลีเซอรอล 10 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง	114