รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ซังข้าวโพดเพื่อการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutyricum*

UTILIZATION OF CORNCOB FOR BUTANOL PRODUCTION FROM *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ซังข้าวโพดเพื่อการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutyricum*

UTILIZATION OF CORNCOB FOR BUTANOL PRODUCTION FROM *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*

นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย
จากทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การใช้ซังข้าวโพดเพื่อการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutyricum*
แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินรายได้คณะ
ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ตุลาคม 2557 ถึงกันยายน 2558
ชื่อ-สกุล นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาหาองค์ประกอบของซังข้าวโพด สภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพ และสภาวะที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อนำมาเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยจากการทดลองพบว่าซังข้าวโพดมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ถึงร้อยละ 51.04 และมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสอยู่ร้อยละ 31.04 และ 27.12 ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ การปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ และทำการปรับค่าพีเอชให้เป็นกลาง และทำการย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัมน้ำหนักของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถึง 0.71 กรัมต่อกรัมน้ำหนักของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ชนิดน้ำตาลที่พบจากของเหลวที่ได้จากการย่อย ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและ น้ำตาลไซโลส แสดงให้เห็นว่ายังมีเฮมิเซลลูโลสในของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพ และเมื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปทำให้เข้มข้นถึง 50 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นชุดควบคุม พบว่าการใช้สารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดเป็นแหล่งน้ำตาลนั้นทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์เพิ่มขึ้น 4.61 กรัมต่อลิตร ภายใน 22 ชั่วโมง ส่วนในชุดควบคุมน้ำหนักเซลล์แห้งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นถึง 18.30 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาบ่มถึง 84 ชั่วโมง ส่วนสารผลิตภัณฑ์พบว่าเชื้อที่ใช้น้ำตาลจากซังข้าวโพดนั้นสามารถผลิตสารได้หลายชนิดมากกว่า โดยสารที่ผลิตได้ ได้แก่ กรดอะซิติก 16.96 กรัมต่อลิตร กรดแลคติก 27.62 กรัมต่อลิตร เอทานอล 4.44 กรัมต่อลิตร และอะซิโตน 2.33 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ : การปรับสภาพ การย่อยด้วยเอนไซม์ การหมักที่สภาวะไร้อากาศ ซังข้าวโพด บิวทานอล

Research Title: Utilization of Corncob for Butanol Production from *Clostridium acetobutilicum*
Researcher: Miss Vorapat Sanguanchaipaiwong
Faculty: Science Department: Biology

ABSTRACT

The aims of this project were to study the composition of corn cobs, the pretreatment using sulfuric acid and sodium hydroxide as well as the optimization of enzymatic hydrolysis for the cultivation of *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Mostly, the compositions of corn cobs were carbohydrates (51.04%) with cellulose (31.04%) and hemicellulose (27.12%). The optimal conditions for hydrolysis of corn cobs to obtain the higest amount of reducing sugars were pretreatment with 1 M sodium hydroxide, following by adjusting pH to neutral and hydrolysis using ACCELLERASE1500 in the ratio of 0.9 mL per gram pretreated corn cobs (in acetate buffer solution 0.05M, pH 5) and incubated at 37°C for 48 hours. It has been found that the reducing sugar content was 0.71 g per g pretreated corn cobs. Reducing sugars obtained from the samples were glucose and xylose, suggesting that there were hemicellulose and cellulose in the pretreated corn cobs. After that, reducing sugar was concentrated up to 50 g/L. *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 (10% v/v) was inoculated into GYCC medium with 50g/L reducing sugars from hydrolyzed corn cobs compared with 50 g/L glucose as a control. As a result of using hydrolyzed corn cobs as a carbon source, dry cell weight was up to 4.61 g/L within 22 hours incubation. The control experiment could increase 18.30 g/L dry cell weight at 84 hours of incubation. More several products were produced using hydrolyzed corn cobs as a carbon source including acetic acid (16.96 g/L), lactic acid (27.62 g/L), ethanol (4.44 g/l) and acetone (2.33 g/L), compared with using glucose as a carbon source.

Keyword: pretreatment, enzymatic hydrolysis, anaerobic fermentation, corn cobs, butanol,

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้คณะ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 และสำเร็จได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ชีววิทยา ที่ให้ความกรุณา ในการเบิกอุปกรณ์ ดูแลความเรียบร้อย อีกทั้งเป็นธุระในการติดต่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกเวลาราชการ นักศึกษาโครงงานพิเศษที่มีส่วนร่วมทำงานงานวิจัยชิ้นนี้ โดยเฉพาะนางสาวณัฐชา เฉลยจิตรธรรม นายธนา เตชะสนธิชัย และนางสาวธัญชนก วุฒิรัตน์

ขอขอบพระคุณ คุณปิยะพร เล็กวัฒนะ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์องค์ประกอบวัตถุดิบ

ขอขอบพระคุณ คุณสิริธร ธีระเวทย์ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์ในเก็บรักษาและฝากเชื้อ

สุดท้ายนี้ผู้ทำวิจัย ขอขอบพระคุณบุพการีที่ได้อบรมเลี้ยงดู และคอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุน และให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งเสมอมา

ผู้จัดทำรายงานวิจัย
นางสาววรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ญ
คำย่อและสัญลักษณ์..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 ข้าวโพด..... 3
2.1.1 ประวัติของข้าวโพด..... 3
2.1.2 ลักษณะทั่วไป และลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 4
2.1.3 ชนิดของข้าวโพด..... 6
2.1.4 การขยายพันธุ์..... 8
2.1.5 นิเวศวิทยา..... 9
2.1.6 การเก็บเกี่ยว..... 10
2.1.7 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร..... 11
2.2 บิวทานอล..... 14
2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล..... 14
2.2.2 ความสำคัญของบิวทานอล..... 15
2.3 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE Fermentation)..... 17
2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล..... 19
2.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of fermentation)..... 22
2.4 การย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis)..... 25
2.4.1 การไฮโดรไลซิสด้วยกรด..... 25
2.4.2 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์..... 25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการย่อย (Pretreatment)..... 31
2.5.1 วิธีการเตรียมทางกายภาพ (Physical pretreatment)..... 33
2.5.2 วิธีการเตรียมทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical pretreatment)..... 33
2.5.3 วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)..... 34
2.5.4 วิธีการเตรียมทางชีวภาพ (Biodegradation pretreatment)..... 35
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 35
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน..... 38
3.1 วัสดุและอุปกรณ์..... 38
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์..... 38
3.1.2 สารเคมี..... 38
3.1.3 อุปกรณ์..... 38
3.1.4 ซังข้าวโพด..... 39
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 39
3.2.1 อาหาร Difco™ Reinforced Clostridial (RCM)..... 39
3.2.2 อาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine ; GYCC)..... 40
3.3 การเตรียมซังข้าวโพด..... 40
3.4 การปรับสภาพซังข้าวโพด..... 40
3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น..... 41
3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด..... 41
3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส..... 41
3.5 การปรับค่าพีเอชหลังการปรับสภาพ..... 41
3.5.1 การปรับค่าพีเอชแบบปกติ..... 42
3.5.2 การปรับค่าพีเอชแบบประหยัดน้ำ..... 42
3.6 การย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 42
3.7 การผลิตบิวทานอล..... 43
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 43
3.7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792..... 43
3.8 การวิเคราะห์..... 44
3.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร..... 44
3.8.1.1 ปริมาณความชื้น..... 44

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8.1.2 ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method..... 44
3.8.1.3 ปริมาณไขมัน..... 45
3.8.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ..... 46
3.8.1.5 ปริมาณเถ้า..... 46
3.8.1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต..... 46
3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน..... 47
3.8.2.1 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส..... 47
3.8.2.2 ปริมาณเซลลูโลส..... 47
3.8.2.3 ปริมาณลิกนิน..... 48
3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี..... 48
3.8.3.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid Method..... 48
3.8.3.2 ค่าพีเอช..... 49
3.8.3.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง..... 49
3.8.3.4 ปริมาณบิวทานอล และสารอินทรีย์อื่นๆ..... 49
3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 49
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 50
4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด..... 50
4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด..... 51
4.2 การปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อย..... 52
4.2.1 ผลของสารละลายกรดและเบสต่อการปรับสภาพซังข้าวโพด..... 52
4.2.2 การศึกษาการปรับค่าพีเอชให้ประหยัดน้ำก่อนการย่อย..... 54
4.3 การย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 56
4.3.1 การเปรียบเทียบอัตราส่วนเอนไซม์ต่อซังข้าวโพด..... 56
4.3.2 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 62
4.3.3 ผลของความเข้มข้นสารละลายกรด และเบสที่ใช้ในการปรับสภาพต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส..... 63
4.3.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลว-สมรรถนะสูง..... 66
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ Clostridium acetobutylicum..... 68
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 77

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1 สรุปผลการวิจัย.....78
5.2 ข้อเสนอแนะ.....78
เอกสารอ้างอิง.....79
ภาคผนวก.....85
ภาคผนวก ก 86
ภาคผนวก ข 96

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพด..... 13
2.2 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ..... 13
2.3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล ก๊าซโซลีน และเอทานอล..... 16
2.4 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์กับการย่อยด้วยกรดและด่าง..... 31
4.1 ส่วนประกอบของซังข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง..... 51
4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใส ซึ่งแยกจากตะกอนซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว..... 53
4.3 ค่าพีเอชของน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างของแข็งในแต่ละรอบ และปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ใช้ในการล้างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยทำการล้างรอบละ 100 มิลลิลิตร..... 55
4.4 ค่าพีเอชของน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างของแข็งในแต่ละรอบโดยล้างแบบสลับ ระหว่างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดและของแข็งที่ปรับสภาพด้วยเบส และปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ใช้ในการล้างของแข็ง โดยทำการล้างรอบละ 100 มิลลิลิตร..... 55
4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 โมลาร์..... 59
4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์..... 60
4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น..... 61
4.8 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE1500 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสย่อยซังข้าวโพด ที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร 36 ชั่วโมง ส่วนซังข้าวโพด ที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร 48 ชั่วโมง และซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่นใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร 24 ชั่วโมง..... 63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 โดยตัวอย่างที่ปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ และตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์.....65
4.10 ชนิดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด เบส และน้ำกลั่น จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....67
4.11 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร.....71
4.12 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร..... 72
4.13 ความเข้นข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นเอทานอล ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งน้ำตาล..... 73
4.14 ความเข้นข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นกรดแลคติก ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาล เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร.....74
4.15 ความเข้นข้นเอทานอล และความเข้มข้นอะซิโตน ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร.....75

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะส่วนต่างๆของข้าวโพด (Zea mays)..... 5
2.2 ส่วนต่างๆของลำต้นข้าวโพดหวาน.....6
2.3 แปลงปลูกข้าวโพดหวาน.....10
2.4 ต้นข้าวโพดหวานที่เจริญเติบโตเต็มที่.....11
2.5 ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เก็บเกี่ยวมาจากต้น.....11
2.6 ซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.....12
2.7 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล.....14
2.8 กระบวนการผลิตไบโอบิวทานอล..... 18
2.9 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*.....21
2.10 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*..... 21
2.11 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium spp.* 23
2.12 กลไลการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส..... 27
2.13 กลไกการทำงานและตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา..... 28
2.14 การย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส..... 28
2.15 วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ.....32
4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว..... 53
4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELLERASE1500 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งซังข้าวโพดผ่านการปรับสภาพด้วย (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ (ค) น้ำกลั่น..... 57
4.3 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE1500 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ย่อยซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น โดยมีการใช้ และไม่ใช้บัฟเฟอร์..... 62
4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1 โมลาร์..... 64

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1 โมลาร์..... 65
4.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ..... 69
4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรโดยทำการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน..... 70

คำย่อและสัญลักษณ์

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

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

งานวิจัยนี้ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือซังข้าวโพด เนื่องจากในปัจจุบันมีเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและการบริโภค อย่างเช่นซังข้าวโพดเป็นจำนวนมาก โดยซังข้าวโพดส่วนใหญ่ถูกนำทิ้ง และไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ เช่น นำไปทำเป็นอาหารสัตว์ และการนำมาใช้ทำปุ๋ยก็ย่อยสลายยาก ทำให้ทางเลือกสุดท้ายคือใช้การเผาเป็นการกำจัดซังข้าวโพด อีกทั้งการปล่อยให้ย่อยสลายเองด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติก็ใช้เวลานาน และทำให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่ชั้นบรรยากาศ ทำให้ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบที่มีความน่าสนใจ ในการนำมาใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้

ในปัจจุบันนี้มีการใช้บิวทานอลเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ทั้งอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ อุตสาหกรรมอาหารและกลิ่นรส และอุตสาหกรรมเคมี เนื่องจากบิวทานอลเป็นสารที่ไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรงระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำ สารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน คือเมทานอล (คาร์บอน 1 คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (ชนิกา และคณะ, 2555; สุนทร และอภิชัย, 2555) ดังนั้น ในปัจจุบัน การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลบางส่วนจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งทั่วโลก เนื่องจากการผลิตสารละลายอินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพ จากการใช้จุลินทรีย์หมักสารชีวมวลเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Dürre, 1998; Lee และคณะ, 2008)

นอกจากกระบวนการทางเคมีซึ่งต้องผลิตจากปิโตรเลียมแล้ว บิวทานอลยังถูกผลิตได้จากกระบวนการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ด้วยเชื้อกลุ่ม Clostridia ในอัตราส่วน 3:6:1 รวมถึงให้ผลพลอยได้เป็นกรดอะซิติก กรดบิวทิริก ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างเป็นท่อน มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ สามารถสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน (Chompunuch และคณะ, 2008; Yukihiro และคณะ, 2005)

ในส่วนของวัตถุดิบที่เป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) จะต้องมีการปรับสภาพก่อนการย่อยเนื่องจากการปรับสภาพจะเป็นการแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออก และปรับโครงสร้างเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม (จีอีอี เมเนจเม้นท์ จำกัด, 2555) คือ ลดความเป็นผลึก

ของเซลลูโลส และเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบ ส่งผลให้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เข้าถึง และทำปฏิกิริยาได้ดี เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต หลีกเลี่ยงการเกิดสารยับยั้งในขั้นตอนการย่อย และกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้แบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ซังข้าวโพด มาทำการปรับสภาพ และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง *C. acetobutylicum* เพื่อผลิตบิวทานอล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของซังข้าวโพด ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้
2. เพื่อศึกษาวิธีการปรับสภาพซังข้าวโพด เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด
3. เพื่อศึกษาการใช้ซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพและย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Glucose Yeast extract Casein Cysteine (GYCC) ที่สภาวะนิ่งและไม่มีออกซิเจน โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ใช้สารที่ได้จากการนำซังข้าวโพดมาปรับสภาพโดยใช้ซังข้าวโพดที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มาทำการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ให้ได้สารละลายน้ำตาล แล้วนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสเป็นชุดควบคุม และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่องมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงแนวทางการปรับสภาพ และการย่อยสลายซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์
2. ทราบถึงแนวทางการผลิตบิวทานอลจากเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ
3. ทราบระยะเวลา และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในการผลิตบิวทานอลจากซังข้าวโพด

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวโพด

2.1.1 ประวัติของข้าวโพด

ข้าวโพด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* เป็นพืชตระกูลเดียวกับหญ้ามีลำต้นสูง โดยเฉลี่ย 2.2 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น 0.5-2.0 นิ้ว (รูปที่ 2.1) ถิ่นกำเนิดแรก พบจากการขุดพบซังข้าวโพดและซากของต้นข้าวโพดที่ใกล้แม่น้ำในรัฐทางตอนตะวันตกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา ติดกับประเทศเม็กซิโก และปัจจุบันนิยมปลูกแพร่หลายในแถบอเมริกา แคนาดา ฯลฯ สามารถปลูกได้ในสภาพที่ภูมิอากาศแตกต่างกันมาก ๆ เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์ เพราะสามารถนำมาเลี้ยงสัตว์ได้ทั้งต้น ใบ และเมล็ด (พันทิพา, 2548; วิจิตรา และคณะ, 2547)

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

2.1.2 ลักษณะทั่วไป และลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ราก รากแรกที่ออกมาจากคัพภะ (embryo) เป็นรากชั่วคราวเรียกว่า ไพรมารี (primary) หรือ เซมินัล (seminal) หลังจากข้าวโพดเจริญเติบโตได้ประมาณ 7-10 วัน รากถาวรจะงอกขึ้นรอบส่วนปลาย ในระดับใต้พื้นดินประมาณ 1-2 นิ้ว รากถาวรนี้ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะแผ่ออกไปโดยรอบประมาณ 100 เซนติเมตร และแทงลึกลงไปในดินแนวดิ่งยาวมากซึ่งอาจยาวถึง 300 เซนติเมตร รากของข้าวโพดเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) นอกจากรากที่อยู่ใต้ดินแล้วยังมีรากยึดเหนี่ยว (bracer root) ซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ ข้อที่อยู่ใกล้ผิวดิน และบางครั้งรากพวกนี้ยังช่วยยึดพื้นดินอีกด้วย ลำต้น ข้าวโพดมีลำต้นแข็ง ไส้แน่นไม่กลวง มีความยาวตั้งแต่ 30เซนติเมตร จนถึง 8 เมตร แล้วแต่ชนิดของพันธุ์ ตามลำต้นมีข้อ (node) และปล้อง (internode) ปล้องที่อยู่ในดินและใกล้ผิวดินสั้น และจะค่อย ๆ ยาวขึ้นไปทางด้านปลาย ปล้องเหนือพื้นดินจะมีจำนวนประมาณ 8-20 ปล้อง พันธุ์ข้าวโพดส่วนมากลำต้นสดมีสีเขียว แต่บางพันธุ์มีสีม่วง ข้าวโพดแตกกอไม่มากนัก ส่วนมากไม่แตกกอทั้งนี้ แล้วแต่ชนิดพันธุ์และสิ่งแวดล้อม ข้าวโพดที่แตกกอได้ 3-4 ต้น เช่น ข้าวโพดหวาน ข้าวโพดที่ปลูกในที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลมาก ๆ อาจแตกกอได้ตั้งแต่ 7-10 ต้น (Koopmans และคณะ, 1996)

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

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

ลำต้น ต้นหนึ่งอาจมีหลายช่อแล้วแต่ชนิดพันธุ์ (รูปที่ 2.1) ดอกตัวเมียแต่ละดอกประกอบด้วยรังไข่ (ovary) และเส้นไหม (silk หรือ style) ซึ่งมีความยาวประมาณ 5-15 เซนติเมตร และยื่นปลายโผล่ออกไปรวมกันเป็นกระจุกอยู่ตรงปลายช่อดอกซึ่งมีเปลือกหุ้มอยู่ ดอกพวกนี้พร้อมที่จะผสมพันธุ์หรือรับละอองเกสรได้เมื่อเส้นไหมโผล่ออกมา หลังจากได้รับการผสมเส้นไหมจะแห้งเหี่ยวและรังไข่เจริญเติบโตเป็นเมล็ด ช่อดอกตัวเมียที่รับการผสมแล้วเรียกว่า ฝัก (ear) แต่ละฝักอาจมีเมล็ดมากถึง 1,000 เมล็ด แกนกลางของฝักเรียกว่า ซัง (cob) (Koopmans และคณะ, 1996)

ช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมีย (รูปที่ 2.1) อยู่บนต้นเดียวกันแต่ต่างตำแหน่งกัน ช่อดอกเพศผู้เป็นช่อดอกแบบแยกแขนง อยู่ตรงส่วนปลายสุดของลำต้น มีความยาวประมาณ 40 เซนติเมตร มีช่อดอกย่อยแตกแขนงออกจากแกนกลางจำนวนหลายช่อ มีช่อดอกย่อยแบบช่อเชิงหลั่น เจริญ

ออกมาจากทางด้านข้างของช่อย่อยเหล่านี้ ช่อย่อยที่แยกแขนงออกมานี้ประกอบด้วย ช่อดอกย่อยที่ไม่มีก้านดอกย่อย 1 ช่อ และช่อดอกย่อยที่มีก้านดอกสั้นๆ 1 ช่อ แต่ละช่อมีความยาว 8-13 เซนติเมตร ประกอบด้วยกาบช่อย่อย 2 กาบ และดอกย่อย 2 ดอก แต่ละดอกมีกาบล่างรูปไข่ 1 กาบ กาบบนผอมบาง 1 กาบ กลีบเกล็ดอ่อนนุ่ม 2 กลีบ เกสรเพศผู้ 3 อัน (Koopmans และคณะ, 1996)

รูปที่ 2.1 ลักษณะส่วนต่างๆ ของข้าวโพด (*Zea mays*) 1. ส่วนโคนลำต้น 2. ส่วนกลางลำต้นที่มีช่อดอกเพศเมียเจริญออกมา 3. ส่วนปลายยอดสุดของลำต้นที่มีช่อดอกเพศผู้ 4.ฝักแก่ที่เจริญจากช่อดอกเพศเมีย
ที่มา : Koopmans และคณะ (1996)

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

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

ผล จะเป็นทรงกระบอกยาว เป็นผลแบบธัญพืช (caryopsis) แต่นิยมเรียกว่าเมล็ด ในฝัก 1 ฝักมีเม็ดเกาะอยู่ประมาณ 8 แถว แต่ละแถวจะมีจำนวนประมาณ 30-100 เมล็ดต่อฝัก ลักษณะรูปร่างคล้ายรูปไข่กลับแผ่แบน มีสีขาว เหลืองอ่อน เหลืองสด เหลืองเข้ม แดง ม่วง และเกือบดำ (Koopmans และคณะ, 1996) ดังรูปที่ 2.1 และ 2.2

รูปที่ 2.2 ส่วนต่างๆ ของลำต้นข้าวโพดหวานที่ประกอบด้วยใบ ช่อดอกเพศเมีย ช่อดอกเพศผู้ และฝักที่มีผลและเมล็ดติดอยู่ โดยมีเปลือกหุ้มฝักไว้หลายชั้น
ที่มา : Koopmans และคณะ (1996)

2.1.3 ชนิดของข้าวโพด

ข้าวโพดที่ใช้เลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ ที่นิยมปลูกในประเทศไทย เช่น กัวเตมาลา พีบี 12 พีบี 5 ข้าวโพดเหนียว และโอเปค-2 มีเมล็ดตั้งแต่สีขาว สีเหลืองไปจนถึงสีแดง ขนาดของเมล็ดขึ้นอยู่กับพันธุ์ โดยทั่วไปจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.5 -0.8 เซนติเมตร ก่อนนำมาเลี้ยงสัตว์จึงต้องบดก่อนเพื่อช่วยให้การย่อยและการผสมได้ผลดีขึ้นที่บดแล้วจะมีขนาดประมาณ 1 - 8 มิลลิเมตร โดยทั่วไปข้าวโพดจัดออกเป็น 7 กลุ่ม คือ

- ข้าวโพดป่า (pod corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays tunica* เป็นข้าวโพดที่มีวิวัฒนาการน้อยที่สุดโดยมีใบประดับหุ้มฝักขนาดเล็กที่มีผลหรือเมล็ดรูปสามเหลี่ยม มีเปลือกเมล็ดแข็งมาก มีเพียง 6-10 เมล็ดในแต่ละฝัก ไม่มีการปลูกข้าวโพดสายพันธุ์นี้ในทางการค้าแต่ชาวอินเดียแดงยังคงปลูกไว้สำหรับใช้ในพิธีกรรม มีการค้นพบเมล็ดข้าวโพดลูกผสมระหว่างข้าวโพดป่าและข้าวโพดปลูกในซากเมืองโบราณที่มีอายุประมาณ 7,000 ปีมาแล้ว (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดคั่ว (pop corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays everta* เป็นข้าวโพดที่มีเมล็ดเล็ก มีบริเวณโคนเมล็ดเรียวแหลม มีเนื้อเมล็ดเป็นแป้งแข็งอยู่ภายนอก และภายในเป็นแป้งอ่อน เมื่อได้รับความร้อนความชื้นที่มีอยู่ภายในเมล็ดจะกลายเป็นไอและมีความดันมาก ทำให้เมล็ดระเบิด

ออกมาเห็นเนื้อสีขาวฟูนุ่มเป็นข้าวโพดคั่ว แต่เมล็ดต้องมีความชื้นในเมล็ดประมาณร้อยละ 13 - 14.5 จึงจะสามารถคั่วให้เมล็ดแตกออกมาได้ พันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ลูกผสมจากสหรัฐอเมริกาและสเปน และกำลังมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดคั่วโดยศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ซึ่งข้าวโพดชนิดนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและเม็กซิโก (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดไร่หัวบุบ (dent corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays indentata* เป็นข้าวโพดที่มีเมล็ดใหญ่และแบน ส่วนบนของเมล็ดจะบุบหรือยุบลงมาเล็กน้อย เนื่องจากมีแป้งอ่อนอยู่ส่วนนอกของเมล็ด เมล็ดหดตัวเหี่ยวย่นเมื่อแห้ง เมล็ดแบนกว้างมักมีสีเหลือง หรือขาว เป็นข้าวโพดที่ให้ผลผลิตสูง และมีความสำคัญสูงสุดต่อการผลิตข้าวโพดของโลก (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดไร่หัวแข็ง (flint corn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays in durata* เป็นข้าวโพดที่มีสีสันต่างๆ หลายสี มีเอนโดสเปิร์มแข็งและมีแป้งอ่อนบริเวณตรงกลาง เมล็ดมีส่วนปลายกลมและมีขนาดเล็กกว่าข้าวโพดไร่หัวบุบ สุกแก่เร็วกว่า มีความแข็งมากกว่า และเมื่อแห้งทนต่อการกัดแทะของแมลงได้ดีกว่า เป็นข้าวโพดที่นิยมปลูกรองลงมาจากข้าวโพดไร่หัวบุบในทวีปยุโรป เอเชีย อเมริกากลาง อเมริกาใต้ และเขตร้อนชื้นของทวีปแอฟริกา ส่วนในประเทศไทยได้รับความนิยมมากกว่าและราคาดีกว่าข้าวโพดไร่หัวบุบ พันธุ์ที่นิยมปลูก ได้แก่ สุวรรณ 1 สุวรรณ 2 สุวรรณ 5 และนครสวรรค์ 1 (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดแป้ง (flour corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays amylocea* เป็นข้าวโพดที่มีสีสันต่างๆ แป้งในเมล็ดเป็นแป้งอ่อน สามารถเคี้ยวเป็นอาหารและบดเป็นแป้งได้ง่ายกว่าข้าวโพดไร่หัวแข็ง เป็นข้าวโพดที่ปลูกกันมาแต่ดั้งเดิม และปลูกทั่วไปในเขตที่อากาศค่อนข้างแห้งของสหรัฐอเมริกา อเมริกาตะวันตกเฉียงใต้ และแอฟริกาใต้ (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดหวาน (sweet corn) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays saccharata* มีเอนโดสเปิร์มที่มีลักษณะเป็นมันวาว มีแป้งเล็กน้อย เมล็ดเหี่ยวย่นเมื่อแห้ง มีน้ำตาลในเมล็ดมากมักนิยมรับประทานฝักสด ปลูกมากในสหรัฐอเมริกา และกำลังเป็นที่นิยมในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทยด้วย ซึ่งพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยได้แก่ ซุปเปอร์สวีทดีเอ็มอาร์ ฮาวายเอี้ยนซุปเปอร์สวีท ซุปเปอร์อาร์โก อินทรี 2 ซูการ์ 73 ซูการ์ 74 สวีททูโทน ยูนิซีดส์ รอยัลสวีท (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

- ข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays ceratina* แป้งในเมล็ดมีอะไมโลเพคทิน (amylopectin) ปริมาณมาก ทำให้มีลักษณะเหนียวเมื่อสุกแล้ว ชาวเอเชียชอบรับประทาน พบครั้งแรกในประเทศจีนและถูกนำเข้าสู่สหรัฐอเมริกาเมื่อต้นศตวรรษที่ 20 ในประเทศไทยเรียกข้าวโพดข้าวเหนียว หรือข้าวโพดเทียน พันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทยคือ สุโขทัย 1 มีการนำไปใช้ผลิตสารจำพวกกาวแทนแป้งจากมันสำปะหลังในสหรัฐอเมริกา นิยมปลูกมากในเอเชียตะวันออก (ทวีศักดิ์, 2540; Koopmans และคณะ, 1996; Levetin และ McMahon, 2003)

ในปัจจุบันพันธุ์ข้าวโพดที่นิยมปลูกขึ้นอยู่กับ อายุการเก็บเกี่ยว สีของเมล็ด ขนาดของฝัก ความสูงของลำต้น รสชาติ ความต้านทานต่อโรคและแมลง รวมทั้งความเป็นที่ต้องการของตลาด โดยลักษณะตามต้องการมักได้จากการผลิตข้าวโพดลูกผสมเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีจากต้นพ่อและต้นแม่ โดยเป็นลักษณะที่เกิดจากการผสมตัวเอง (self-pollination) หลายชั่วจากบรรพบุรุษ จนกระทั่งได้ลักษณะสายพันธุ์ที่คงที่ เมื่อนำต้นพ่อและต้นแม่ต่างสายพันธุ์มาผสมกันจะได้พันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single-cross) ถ้านำลูกผสมเดี่ยวที่ได้ไปผสมกับต้นพ่อจะได้ลูกผสมกลับ (back-cross) ถ้านำลูกผสมเดี่ยวจากต้นพ่อและต้นแม่สองคู่มาผสมกันจะได้พันธุ์ลูกผสมสองทาง (double-cross) และถ้านำไปผสมกับลูกผสมเดี่ยวจากพ่อแม่คู่อื่นต่อไป จะได้พันธุ์ลูกผสมสามทาง (triple-cross) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดในปัจจุบัน (Levetin และ McMahon, 2003)

2.1.4 การขยายพันธุ์

ข้าวโพดขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดลงในแปลงปลูกโดยตรง เมื่อมีการเตรียมดินในบริเวณที่น้ำเพียงพอและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อาจปลูกโดยการหยอดเมล็ดด้วยมือหรือเครื่องหยอดเมล็ดลงในร่อง บนพื้นราบ หรือบริเวณเชิงเขา แต่การปลูกบริเวณเชิงเขานั้นดินควรมีความเหนียว และมีน้ำหนักมากพอสมควรเพื่อป้องกันการชะล้างของหน้าดิน

ระยะห่างระหว่างแถวตั้งแต่ 60-100 เซนติเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพของดิน ปริมาณน้ำฝน วิธีการให้น้ำในการชลประทาน พันธุ์ที่นำมาปลูก และวิธีการในการปลูก การทิ้งระยะห่างระหว่างแถวปลูกกว้างมาก จะทำให้มีวัชพืชเจริญเติบโตแทรกอยู่ระหว่างแถวมาก และมีการชะล้างของหน้าดินได้ง่าย

พื้นที่ 1 ไร่สามารถปลูกข้าวโพดได้ตั้งแต่ 3,200 – 12,800 ต้นต่อไร่ ใช้เมล็ดข้าวโพดหนักประมาณ 1.5-3.8 กิโลกรัมต่อไร่ โดยฝังเมล็ดลงในดินลึก 3-6 เซนติเมตร ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพของดินอุณหภูมิและแสง อาจมีการใส่ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยเคมีลงไปพร้อมๆ กับการหยอดเมล็ด ในแปลงปลูกขนาดเล็กอาจมีการปลูกสลับกับพืชอื่นๆ ในแปลงปลูก ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว หรือถั่วอื่นๆ มันสำปะหลัง มันเทศ และผักต่างๆ ในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการปลูกข้าวโพด 3 แบบ คือ

1.พื้นที่ขนาดใหญ่ปลูกข้าวโพดเพียงอย่างเดียวตลอดปี

2.ปลูกสลับกับการทำนาข้าว ซึ่งมีการปลูกข้าวในฤดูฝน และช่วงฤดูอื่นเปลี่ยนมาปลูกข้าวโพดแทน

3.ปลูกแบบไร่เลื่อนลอย มีการถากถางป่าแล้วเปลี่ยนพื้นที่ปลูกไปเรื่อยๆ

2.1.5 นิเวศวิทยา

ข้าวโพดถูกปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ให้มีความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศได้หลายแบบ โดยมีกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงแบบพืชซีสี่ (C4-cycle Photosynthetic Pathway) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภูมิภาคที่มีอากาศอบอุ่น ความชื้นในอากาศสูง อุณหภูมิที่ไม่ค่อยเหมาะสมต่อการแทงช่อดอกเพศผู้ คือ 21-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่ใช้ในการงอกของเมล็ด คือ 10 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละวันที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคืออย่างต่ำ 20 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการออกดอกขึ้นกับช่วงวันและอุณหภูมิ ข้าวโพดถูกจัดเป็นพืชวันสั้นสามารถเจริญเติบโตได้ดีตั้งแต่บริเวณเส้นรุ้งที่ 50 องศาเหนือ ถึง 40 องศาใต้ และถ้าปลูกในบริเวณเขตศูนย์สูตร สามารถปลูกในบริเวณพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลได้ถึง 3,000 เมตร ในเขตที่เส้นรุ้งสูงกว่าหรือต่ำกว่าบริเวณที่เหมาะสมนี้ข้าวโพดจะไม่ค่อยออกดอก แต่มีการปลูกต้นข้าวโพดสำหรับเป็นพืชอาหารสัตว์

ในขณะที่ข้าวโพดสร้างช่อดอกเพศผู้และมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นนั้น ความชื้นในอากาศโดยรอบที่เหมาะสมมีความจำเป็นมาก ในการปลูกข้าวโพดแต่ละครั้งต้องแน่ใจว่าข้าวโพดจะได้รับน้ำเพียงพอตลอดฤดูกาลปลูก ในเขตร้อนชื้นมีปริมาณน้ำฝนที่พอเหมาะคือ 600-900 มิลลิเมตร ตลอดฤดูกาลปลูก ข้าวโพดมีระบบรากที่ลึกและแผ่กว้างมาก จึงทำให้ข้าวโพดสามารถทนทานต่อความแห้งแล้งในบางช่วงของการเจริญเติบโตได้ ข้าวโพดสามารถเจริญเติบโตได้ในดินหลายชนิด แต่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนที่มีการระบายน้ำและการระบายอากาศดี มีหน้าดินลึกและมีอินทรียวัตถุสูง ปริมาณผลผลิตจะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณธาตุอาหารในดิน ข้าวโพดมักถูกปลูกเป็นพืชเบิกนำภายหลังจากมีการถากถางพืชเดิมออก เนื่องจากเป็นพืชซึ่งต้องการดินที่มีลักษณะทางกายภาพและสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในดินสูง ค่าความเป็นกรดด่างของดินที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.5 - 7 ไม่ทนทานต่อสภาพดินเค็ม และดินที่ปลูกข้าวโพดในระยะแรกอาจมีการถูกชะล้างหน้าดินได้ง่ายมาก เนื่องจากรากยังไม่สามารถหยั่งลึกลงไปในดินได้มากนัก และใบยังมีขนาดเล็กไม่สามารถปกคลุมผิวหน้าดินได้ (Koopmans และคณะ, 1996) ในการเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่เหมาะสมสำหรับปลูกขึ้นอยู่กับ อายุการเก็บเกี่ยว สีของเมล็ด ขนาดของฝัก ความสูงของลำต้น รสชาติ ความต้านทานต่อโรคและแมลง รวมทั้งความเป็นที่ต้องการของตลาด (Levetin และ McMahon, 2003)

2.1.6 การเก็บเกี่ยว

ใช้แรงงานคนหักฝักข้าวโพด และมีการพัฒนาใช้เครื่องจักรกลเก็บเกี่ยวในพื้นที่ปลูกขนาดใหญ่ของประเทศไทย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีอายุเก็บเกี่ยว 50-60 วัน หลังจากแทงช่อดอก โดยช่อดอกเพศเมียจะเริ่มเจริญโผล่ให้เห็นทางซอกใบ เมื่ออายุ 60-70 วัน และช่อดอกเพศผู้เจริญโผล่ให้เห็นที่ส่วนยอดของลำต้นเมื่ออายุ 50-60 วัน ข้าวโพดบางสายพันธุ์มีอายุเก็บเกี่ยวสั้นเพียง 90 วันหลังปลูก บางสายพันธุ์อาจยาวนานถึง 200 วัน ส่วนข้าวโพดฝักอ่อนและข้าวโพดรับประทานฝักสดมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นกว่าทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของข้าวโพดด้วย (Koopmans และคณะ, 1996)

ในการเก็บเกี่ยวฝักข้าวโพดที่แก่จัด จะกระทำเมื่อใบข้าวโพดเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เปลือกหุ้มฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีลักษณะแห้ง ผิวเมล็ดมีลักษณะใส ในช่วงฤดูแล้งอาจปล่อยฝักข้าวโพดทิ้งไว้บนต้นเพื่อเป็นการลดความชื้นของเมล็ด (รูปที่ 2.4) โดยการตากแดดให้มีความชื้นของเมล็ดเหลือร้อยละ 15-20 ก่อนทำการเก็บเกี่ยว อาจเก็บเกี่ยวเฉพาะฝักข้าวโพด หรือเก็บทั้งเปลือกนอกที่หุ้มฝักข้าวโพดก็ได้ ทั้งนี้เพื่อที่จะนำส่วนของฝักมาผูกติดกัน แล้วตากเมล็ดให้แห้งในโรงเรือนต่อไป (Koopmans และคณะ, 1996)

รูปที่ 2.3 แปลงปลูกข้าวโพดหวาน
ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2535)

การนวดเมล็ดออกจากฝักทำได้โดยใช้มือคนแกะเมล็ดข้าวโพดออกมา หรือใช้เครื่องจักรนวดเมล็ดออกจากฝัก จากนั้นนำไปตากแห้งอีก 2-3 วัน เพื่อลดระดับความชื้นของเมล็ดลงมาให้เหลือร้อยละ 12-13 ก่อนนำไปบรรจุในถุงผ้า กระสอบ กระป๋อง หรือตะกร้า แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในโรงเรือน (Koopmans และคณะ, 1996)

รูปที่ 2.4 ต้นข้าวโพดหวานที่เจริญเติบโตเต็มที่
ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2535)

รูปที่ 2.5 ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เก็บเกี่ยวมาจากต้นแล้ว (ข้าวโพดชนิดหัวแข็ง)
ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2535)

2.1.7 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ซังข้าวโพด (corncob) คือแกนของฝักข้าวโพด หลังจากที่นำฝักข้าวโพดไปกระเทาะเอาเมล็ดข้าวโพดออกแล้ว ดังรูปที่ 2.6ซึ่งจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งในประเทศไทยมักจะพบซังข้าวโพดกองอยู่ทั่วไป ตามพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกข้าวโพด โดยซังข้าวโพดแทบจะไม่มีประโยชน์ เพราะเนื่องจากเมื่อนำไปใช้ทำปุ๋ยหมักก็ย่อยสลายยาก ฉะนั้นในบางพื้นที่เกษตรกรจึงปล่อยทิ้งกองเป็นภูเขา การเผาจึงเป็นวิธีกำจัดซังข้าวโพดอย่างไม่มีทางเลือก ต่อมาจึงมีการทำเป็นถ่านอัดแท่งจากซังข้าวโพด แต่ก็มีอยู่ในวงจำกัด การปล่อยทิ้งซังข้าวโพดให้ย่อยสลายไปเองโดยจุลินทรีย์ ใช้เวลานานและเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กลับคืนสู่บรรยากาศ ส่วนการเผาซังข้าวโพดเป็นวิธีการกำจัดที่เร็วแต่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าสู่ชั้นบรรยากาศเช่นกัน (นัย, 2555; วิเชียร และคณะ, 2536)

รูปที่ 2.6 ซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ที่มา : https://www.exoticblanks.com/Corn-Cob-Pen-Blanks-Stabilized-Large.html (15 พฤษภาคม 2558)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง ยางพารา และน้ำมันปาล์ม เป็นต้น โดยที่ผลผลิตทางการเกษตรบางชนิดเป็นสินค้าส่งออกไปอย่างต่างประเทศ ทำรายได้ให้กับประเทศหลายล้านบาท ซึ่งในการเก็บเกี่ยวผลผลิตและแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรเหล่านี้ก่อให้เกิดชีวมวลหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ซังข้าวโพด เศษไม้ยางพารา ฟางข้าว เหง้ามันสำปะหลัง และชานอ้อย เป็นต้น (พชร และคณะ, 2554)

เนื่องจากข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย และข้าวโพดเป็นพืชที่เหมาะกับสภาพภูมิอากาศ รวมถึงใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกไม่นาน ทำให้เป็นพืชไร่ที่เกษตรกรนิยมปลูก ซึ่งข้าวโพด 1 กระสอบ จะมีน้ำหนักประมาณ 90 - 100 กิโลกรัม และผลผลิตต่อไร่ประมาณ 1,100 - 1,800 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อนำฝักมากระเทาะเมล็ดก็จะเหลือซังข้าวโพด กลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรจำนวนมาก โดยจะมีผลพลอยได้เหล่านี้ทั้งในช่วงต้นฤดูฝน ปลายฤดูฝน และต้นฤดูร้อน (พิเชษฐ์ และคณะ, 2555; คนึงศักดิ์ และคณะ, 2555) คุณค่าทางอาหารและองค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพดในแต่ละส่วน ก็จะมีความแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.1

องค์ประกอบที่สำคัญที่จะเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างซังข้าวโพดให้สูงขึ้น โดยจะเพิ่มมูลค่าด้วยการใช้เทคโนโลยีเพื่อเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่พบในพืชให้เป็นน้ำตาล เพื่อนำน้ำตาลไปใช้งานต่อ ซึ่งส่วนประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยที่เซลลูโลส จะประกอบด้วยกลูโคสสายโมเลกุลยาว อยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว และไม่ละลายน้ำ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น ตลอดจนสาร acetyl เนื่องจากโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีการแตกกิ่งมาก และไม่เป็นผลึก และนอกจากนั้นยังมีส่วนประกอบรองของพืชอื่นๆอีก ได้แก่ ลิกนินที่เป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน

(Phenylpropane) ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตที่ยึดเหนี่ยวพนังเซลล์ของพืชเข้าด้วยกัน ซึ่งเป็นส่วนที่สร้างความแข็งแรงให้แก่พืช (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2549; บุษยมาศ, 2554)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพด

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

ที่มา : จินดา (2536)

โดยปกติปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ

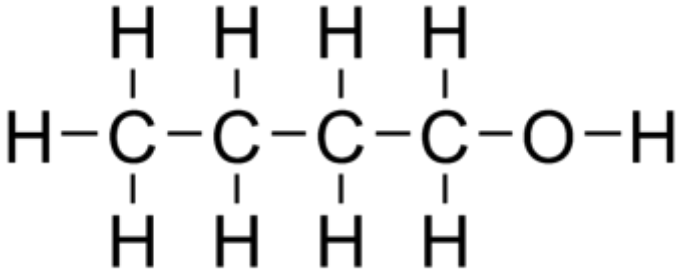
ชีวมวล	ส่วนประกอบภายในเซลล์พืช (ร้อยละ)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าว	32.1	24	12.5
ฟางข้าวสาลี	30.5	28.4	18
ชานอ้อย	33.4	30	18.9
ซังข้าวโพด	45	35	15
ต้นปาล์ม	37.14	30.59	22.32
ต้นมันสำปะหลัง	32.2	13.85	26.96

ที่มา : พรรณวิไล (2545)

2.2 บิวทานอล

2.2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับบิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC Nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) เป็นที่รู้จักกัน คือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl Alcohol) มีองค์ประกอบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 4 คาร์บอนอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ (4-carbon Aliphatic Alcohol) สายตรง มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH ดังรูปที่ 2.7 น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล บิวทานอลไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำเล็กน้อย (Slightly Hydrophobic Liquid) มีกลิ่นคล้ายคลึงกับกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนัง มีคุณสมบัติสามารถรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่สามารถแยกออกจากน้ำ สารเคมีอื่นๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน คือเมทานอล (คาร์บอน 1 คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Dürre, 2008; Lee และคณะ 2008)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล

ที่มา : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Butanol_flat_structure.png

(17 พฤศจิกายน 2557)

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักผ่านกระบวนการที่เรียกว่า ABE fermentation ซึ่งใช้แบคทีเรียในการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลจากสารชีวมวล ทั้งนี้ ABE เป็นกระบวนการที่รู้จักกันดีและเริ่มใช้ครั้งแรกในการผลิตอะซิโตนในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการออกซิเจนจึงต้องมีการไล่อากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน โดยให้ผลผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ในอัตราส่วน 3:6:1 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้แบคทีเรีย *Clostridium* sp. ในการผลิต โดยเฉพาะ *C. acetobutylicum* ที่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด รวมทั้งสายพันธุ์ *C. beijerinckii* ก็ถูกใช้ในกระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีเช่นกัน (ชนิกา และคณะ, 2555; สุนทร และคณะ, 2555)

2.2.2 ความสำคัญของบิวทานอล

เนื่องจากมีการใช้น้ำมันปิโตรเลียมที่สูงขึ้น ราคาที่พุ่งขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อทดแทนบางส่วนของการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งทั่วโลก เมื่อเปรียบเทียบเชื้อเพลิงทดแทนทั้งหมดแล้ว ไบโอบิวทานอลจึงมีบทบาทสำคัญในยุคต่อไปของเชื้อเพลิงชีวภาพ (Dürre, 1998) โดยที่การผลิตอะซิโตนและบิวทานอลจากการหมักของจุลินทรีย์ในสกุลนี้จากของเสียจำพวกสารชีวภาพทางการเกษตร เช่น เศษไม้ ซังข้าวโพด ฟางข้าว และกากชานอ้อย กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในโรงงานต่างๆ ในยุโรปและอเมริกา เนื่องจากการผลิตสารละลายอินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพ จากการใช้จุลินทรีย์หมักสารชีวมวลเป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมโดยไม่ก่อให้เกิดมลพิษและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ปัจจุบันบิวทานอลเป็นสารเคมีที่สำคัญที่ผลิตได้ประมาณ 5-10 ล้านตัน และถูกคาดการณ์ในอนาคตไว้ว่า อัตราการเพิ่มการผลิตบิวทานอลจะสูงขึ้นถึงร้อยละ 3 ต่อปี ในอนาคต (ชนิกา และคณะ, 2555; Lee และคณะ, 2008)

และอีกจุดเด่นหนึ่งของบิวทานอลที่ผลิตได้ทางชีวภาพที่มีความสำคัญ ซึ่งเหนือกว่าเอทานอล คือสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ได้โดยตรง ในขณะที่เอทานอลจะต้องมีการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการ เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง (Hansen และคณะ, 2005) ทั้งนี้บิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านการดัดแปลงใดๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะทางกายภาพและเคมี รวมทั้งให้ค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอลอย่างมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าพลังงานระหว่างบิวทานอลกับเอทานอล พบว่าบิวทานอลมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนบริสุทธ์ ในขณะที่สารผสมของเอทานอลกับแก๊สโซลีนต้องใช้ปริมาณมากกว่าจึงจะให้ค่าพลังงานที่เท่ากัน นอกจากนี้ บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีน ได้ในอัตราส่วนต่างๆ ได้ (Lee และคณะ, 2008) ในทางตรงกันข้าม เอทานอลสามารถนำไปผสมกับแก๊สโซลีนได้บางส่วนเท่านั้น เช่น ในประเทศบราซิลได้มีการใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนแค่ร้อยละ 23 นอกจากนี้ ในแถบทวีปยุโรปบางประเทศ รวมทั้งประเทศสหรัฐอเมริกาจะใช้สารผสมระหว่างเอทานอลและแก๊สโซลีนเพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นบิวทานอลสามารถนำไปใช้กับเครื่องยนต์โดยไม่ต้องมีการดัดแปลงเครื่องยนต์ และไม่ส่งผลใดๆ ต่อเครื่องยนต์เลย รวมทั้งให้สมรรถนะในการขับเคลื่อนเช่นเดียวกับการใช้แก๊สโซลีนอีกด้วย นอกจากนี้ การเผาไหม้ของเครื่องยนต์ที่มีบิวทานอลเป็นส่วนผสม พบว่าไอเสียที่ออกมาปลอดจากแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ สามารถสรุปข้อได้เปรียบของการใช้บิวทานอลมากกว่าเอทานอล (ชนิกา และคณะ, 2555) ได้ดังนี้

(1) การระเหย (Volatility) ต่ำกว่า จึงเป็นพิษน้อยกว่า (มีค่า Reid Vapor Pressure (RVP) ต่ำกว่า 7.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล)

(2) บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้น จึงมีค่า Hygro-scopicity ต่ำกว่า

(3) บิวทานอลมีค่าการกัดกร่อนต่ำากว่า

(4) การใช้บิวทานอลปลอดภัยกว่าเอทานอลเนื่องจากมีค่าการติดไฟ (Flash Point) สูงกว่าและมีค่าแรงดันเป็นไอต่ำกว่า

(5) มีค่าออกเทนสูงกว่า

(6) บิวทานอลมีค่าพลังงานสูงกว่าเอทานอล โดยบิวทานอลมีค่า 110,000 BTUต่อแกลลอน ในขณะที่เอทานอลมีค่า 84,000 BTUต่อแกลลอน

(7) สามารถผสมรวมกับทั้งก๊าซโซลีนและดีเซลได้สมบูรณ์ดังนั้น จึงทำให้การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีความปลอดภัย รวมทั้งอุปกรณ์ การเก็บ และการเติมบิวทานอลยังสามารถใช้อุปกรณ์ที่ใช้ในสถานีเติมน้ำมันและรถยนต์โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนใดๆเลย

ตารางที่ 2.3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของบิวทานอล ก๊าซโซลีน และเอทานอล

คุณสมบัติ	บิวทานอล	ก๊าซโซลีน	เอทานอล
ความหนาแน่นพลังงาน (Energy Density, MJ/L)	29.2	32	19.6
อัตราส่วนผสมระหว่างน้ำมันและอากาศ (Air-fuel Ratio)	11.2	14.6	9
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (Heat of Vaporization, MJ/kg)	0.43	0.36	0.92
ปริมาณพลังงาน (Energy Content/Value, BTU/gal)	110,000	115,000	84,000
จุดเดือด (Boiling point, ℃)	117.6	27-221	78
ความหนาแน่น ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Density, g/mL)	0.8098	0.7-0.8	0.7851

ที่มา : ชนิกา และคณะ (2555); สุนทร และคณะ (2555)

ในขณะที่การผสมเอทนอลให้อยู่ในระบบต้องจำกัดให้อยู่ในช่วงเวลาสั้นๆ จึงเหมาะสม ทั้งบิวทานอลยังไม่กระทบต่อระบบการเก็บและการเติมของเชื้อเพลิงเหลวเหล่านี้ การที่ค่าแรงดันการเป็นไอ (Vapor Pressure) ของบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเอทานอล 11 เท่า ซึ่งมีค่าเป็น 45 มิลลิเมตรปรอท ที่ 20 องศาเซลเซียส จึงทำให้สามารถเติมโดยตรงกับก๊าซโซลีนโดยไม่มีการสูญเสียจากการระเหย จึงไม่มีผลกระทบอื่นข้างเคียง และจากคุณสมบัติทางกายภาพ-ทางเคมีของบิวทานอลทำให้สะดวกต่อการผสมกับก๊าซโซลีนโดยไม่มีการแยกชั้นขึ้นในที่มีน้ำอยู่ด้วยก็ตาม (เนื่องจากมีการปนของน้ำโดยตรงน้อยมาก) แต่มีค่าออกเทนใกล้เคียงกับก๊าซโซลีน ซึ่งสามารถเติมสารเพิ่มค่าออกเทนได้ เมื่อเปรียบเทียบการผสมเชื้อเพลิงชีวภาพอื่นๆ กับก๊าซโซลีน (ตารางที่2.3) ด้วยเหตุผลดังกล่าว บริษัทน้ำมันหลายๆ บริษัทจึงสนใจและลงทุนในโครงการการผลิตบิวทานอลจากชีวมวล หากดูแล้วบริษัทที่มีความสนใจในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพคือ BP และ Dupont ซึ่งมีความร่วมมือกับหลายองค์กรทางการวิจัยและการศึกษาในการพัฒนาและผลิตไบโอบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมในปี 2006 และเสนอโครงการเพื่อผลิตไบโอบิวทานอล

ปริมาณ 30,000 ตันต่อปี และมีการปรับเปลี่ยนอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้กับเอทานอลของ British Sugar ในอังกฤษ ผลจากการทดสอบจาก BP และ Dupont ในปี 2008 แสดงว่าการใช้ไบโอบิวทานอลสามารถเพิ่มการผสมระหว่างเชื้อเพลิงชีวภาพในก๊าซโซลีนมากกว่าร้อยละ 10 ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ในการผสมระหว่างเอทานอล (แก๊สโซฮอล์ E10) และปราศจากความสมดุลย์ในสมรรถนะของเครื่องยนต์เป็นผลให้ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ในกรณีที่ใช้แก๊สโซฮอล์ที่มีอัตราส่วนเอทานอลสูงขึ้น เช่น E20 หรือ E85

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทางเคมีมากมาย บิวทานอลส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (Ester Derivative) เช่น บิวทิลอะครีเลท (Butyl Acrylate) ซึ่งใช้เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาเคมี เป็นสารเคลือบผิว และเป็นสารผสมในสีนอกจากนี้บิวทานอลยังเป็นสารที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเป็นตัวทำาละลายสำหรับสารเคลือบไม้ และวัสดุต่างๆ ในอุตสาหกรรมเฟอร์นิเจอร์ (Acid Curable Lacquers และ Baking Finish) การใช้ประโยชน์ จากบิวทานอลและสารประกอบอื่นๆ คือ เป็นทินเนอร์ สำาหรับผสมสี (Paint Thinner) เป็นตัวทำาละลายในสี (Solvent for Dyes) เช่น หมึกพริ้นท์ และเป็นสารสกัดในกระบวน การผลิตยาและสารธรรมชาติ เช่น ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic) ฮอร์โมน (Hormones) และวิตามิน (Vitamins) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้บิวทานอลในประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น กระจกนิรภัย (Safety Glass) สารทำความสะอาด (Detergents) อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา (Eye Makeup) ยาทาเล็บ สารในผลิตภัณฑ์การโกนหนวด ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพอนามัย นอกจากนี้เป็นสารสำาหรับการสกัด และอุตสาหกรรมอาหารและกลิ่นรส (พัฒนา และคณะ, 2552)

2.3 กระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (ABE Fermentation)

การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1861 โดยหลุยส์ พาสเตอร์ (Jones และ Woods, 1986) ต่อมา Schardinger ได้ค้นพบอะซิโตนจากกระบวนการเดียวกันกับหลุยส์ พาสเตอร์ในปี ค.ศ. 1905 ซึ่งในกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp. พบว่านอกจากบิวทานอลและอะซิโตนแล้ว แบคทีเรียยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ เอทานอลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบิวทานอลและอะซิโตน โดยกระบวนการหมักนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นเนื่องมาจากปัญหาการขาดแคลนยางธรรมชาติ โดยบิวทานอลเป็นสารตั้งต้นของการผลิตบีต้าไดอีน ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของการผลิตยางสังเคราะห์ ส่วนอะซิโตนนั้นมีความสำคัญในการนำมาเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตวัตถุระเบิดในสงครามโลกครั้งที่ 1 ภายหลังสงครามยุติ ความต้องการอะซิโตนจึงลดน้อยลง แต่กลับมีความต้องการบิวทานอลมากขึ้นในอุตสาหกรรมผลิตรถยนต์ เนื่องจากบิวทานอลสามารถใช้เป็นตัวทำละลายผสมในสารเคลือบเงารถยนต์ และยังใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการผลิตแก้ว ผงซักฟอก เครื่องสำอาง (ชนิกา และคณะ, 2555; สุนทร, 2537)

รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตไบโอบิวทานอล
ที่มา : ชนิกา และคณะ (2555)

แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ สำหรับกระบวนการทางชีวภาพแล้ว การหมักเพื่อผลิตเชื้อเพลิงเหลวเป็นหนึ่งในงานวิจัยที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะทางแถบยุโรปซึ่งมีการทำงานสะสมองค์ความรู้ทางด้านนี้มานานแล้ว กระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและเชื้อเพลิงเหลวเป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ ABE Fermentation ซึ่งมีมาตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 เนื่องจากความจำเป็นในการใช้ตัวทำละลายเหล่านี้ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ส่งผลให้มีการเปิดโรงงานหมักอะซิโตนขึ้น โดยแบคทีเรียสกุลที่นำมาใช้เพื่อผลิต คือ *Clostridium* ซึ่งกระบวนการผลิตไบโอบิวทานอลและการนำไปใช้ (พัฒนา และคณะ, 2555) แสดงดังรูปที่ 2.10

ในปี 1912 ถึงปี 1914 เชม วิทแมนน์ (Chaim Weizmann) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งที่มีความสามารถผลิตอะซิโตนและบิวทานอล ซึ่งต่อมาให้ชื่อจุลินทรีย์นี้ว่า *C. acetobutylicum* โรงงานผลิตอะซิโตนจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้เกิดขึ้นที่อังกฤษในปี 1916 โดยใช้ข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น ในยุคเวลาสงครามโลกครั้งที่ 1 อุตสาหกรรมการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE) โดยใช้จุลินทรีย์ *Clostridium* spp. ประสบความสำเร็จอย่างยิ่ง ในช่วงแรกของศตวรรษที่ 20 การผลิตอะซิโตน-บิวทานอลโดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวแบบบริสุทธิ์ (Pure Culture) นับเป็นการผลิตสารเคมีระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ด้วยจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับกระบวนการหมักขนาดใหญ่ที่อยู่ภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ ดังนั้นประชาชนจึงเห็นความสำคัญการพัฒนาต่อไปสู่กระบวนการหมักสมัยใหม่ ในระยะแรกนั้นการผลิตเพื่อให้ได้อะซิโตนเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ต้องการ เพื่อใช้ในการผลิตชนวนระเบิดที่ประกอบด้วยไนโตรกลีเซอรีนและเซลลูโลสไนเตรท ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตระเบิดจึงมีโรงงานผลิตอะซิโตนจากจุลินทรีย์นี้แพร่หลายไปในอเมริกาและแคนาดา และโรงงานเหล่านี้ได้ปิดลงหลังสิ้นสุดสงครามเนื่องจากความต้องการอะซิโตนลดน้อยลง อย่างไรก็ตามการขยายตัวของอุตสาหกรรมรถยนต์หลังสงครามโลกทำให้เกิดความต้องการบิวทานอลมากขึ้น เนื่องจากบิวทานอลสามารถใช้เป็นตัวทำละลายผสมในแล็คเกอร์ (Lacquer) ซึ่งเป็นสารเคลือบเงารถยนต์ โรงงานต่างๆ ในอเมริกาก็เปิดขึ้น

ใหม่ จนกระทั่งเมื่อสิทธิบัตรโรงงานการผลิตของวิทแมนน์ (Weizmann) ได้สิ้นสุดลงจึงมีโรงงานใหม่ๆ เกิดขึ้นมากมายเพื่อการผลิตอะซิโตนและบิวทานอล ทั้งในญี่ปุ่น อินเดีย ออสเตรเลีย และอเมริกาใต้ โดยใช้ *C. acetobutylicum* เป็นหลักในการผลิต ในยุคปี 1950-1960 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้ ABE หยุดชะงักทั้งหมดทั้งในยุโรปและอเมริกาเหนือ เนื่องจากไม่สามารถแข่งขันได้กับวิธีการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีในประเทศจีนโดยทั่วไปผลผลิตรวม ABE ของ *Clostridium* spp. มีตั้งแต่ 0.9 กรัมต่อลิตร จนถึงสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร และความสามารถในการผลิต คือ 0.04 จนถึง 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความสามารถในการผลิต ABE ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชีวมวลที่ใช้ อุณหภูมิ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม หากจะเน้นความสนใจไปที่กระบวนการผลิตแล้ว ความสามารถในการผลิตสารทำละลายต่างๆ ยังอยู่ในปริมาณจำกัดอยู่ เนื่องจากโดยหลักการแล้ว ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่เกิดความเป็นพิษและเมื่อเซลล์มีการสะสมสารพิษเหล่านั้นจนมากพอ เซลล์จะหยุดการเจริญและตายในที่สุด ปัญหาเหล่านี้เป็นผลมาจากการขาดความทนทานต่อผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายที่จุลินทรีย์หมักและผลิตขึ้นทำให้การผลิตด้วยวิธีนี้ไม่สามารถแข่งขันได้กับวิธีการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีได้

2.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

เชื้อ *Clostridium* spp. แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ และสามารถสร้างสปอร์ชนิดเอนโดสปอร์ (endospore) โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจะทำให้แบคทีเรียสามารถทนทานอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมะสมได้ สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในรูปสปอร์ กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (Exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น *C. tetanus* spp., *C. botulum* spp. เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในช่วงศตวรรษที่ 20 เชื้อ *Clostridium* spp. ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมี ความสามารถในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* เพราะเนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งส่งผลดีต่อกระบวนการหมักโดยลดต้นทุนในการใช้ใบพัดเพื่อให้อากาศ เนื่องจากปกติแล้วราคาใบพัดในถังหมักจะเป็นครึ่งหนึ่งของราคาถังหมัก โดยในสภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียกลุ่มนี้ จะผลิตผลิตภัณฑ์หลักเป็นบิวทานอล และอะซิโตน ต่อมาได้มีการนำแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ ไปสร้างเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ได้จากคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด จำพวกแป้ง น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และน้ำตาลเพนโตส (pentose) (ชนิกา และคณะ, 2555; สุนทร และคณะ, 2555)

จากที่กล่าวมาในข้างต้น แบคทีเรีย *Clostridium* spp. สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมัก โดยวัตถุดิบที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นแบบดั้งเดิมในกระบวนการ

หมักอะซิโตนบิวทานอล และเอทานอลทางการค้านั้น ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวไรย์ เป็นต้น ทั้งนี้ วัตถุดิบเหล่านั้นมีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่มีราคาถูกกว่า อย่างเช่น วัตถุดิบประเภทแป้ง (แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง) ของเสียจากการเกษตร วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร และ Dried distiller's grain and soluble (DDGS) เป็นต้น นอกจากจะเป็นการใช้ประโยชน์จากของเสียทางการเกษตรแล้ว ยังเป็นการช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกทางหนึ่ง ทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องของการขาดแคลนวัตถุดิบในการหมัก (จิณห์จุฑา และคณะ, 2555; Jones และ Woods, 1986; Lee และคณะ, 2008)

C. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Obligate anaerobic bacteria) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive) มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rods shape) (รูปที่ 2.11) ขนาด 0.6-0.9 × 2.4-4.7 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบๆเซลล์ (Peritrichous flagella) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่ (Oval) มีตำแหน่งของสปอร์ค่อนข้างไปทางปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง (Subterminal) ดังรูปที่ 2.9 ไม่มีเอกโซสปอเรียม (Exosporium) ไม่มีรยางค์ (appendage) ผนังเซลล์ประกอบด้วย DL-diaminopimelic acid ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม (Circular) ขอบไม่เรียบ (Irregular) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 - 5 ไมโครเมตร สีของโคโลนีเป็นสีครีม ผิวเป็นมัน และโปร่งแสง (สุนทร และคณะ, 2555) อนุกรมวิธานของเชื้อ *C. acetobutylicum* จะเป็นดังนี้

Kingdom : Bacteria
Division : Firmicutes
Class : Clostridia
Order : Clostridiale
Family : Clostridiaceae
Genus : *Clostridium*
Species : *C. acetobutylicum*

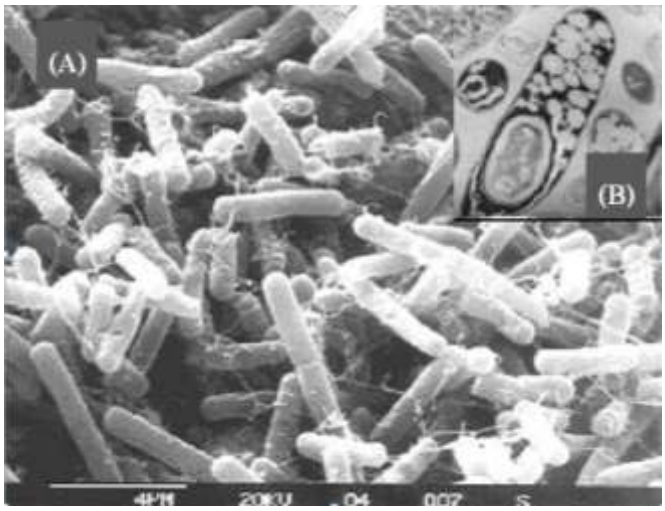
วงจรชีวิตและการเจริญของแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ ซึ่งมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนและสอดคล้องกับการสร้างผลิตภัณฑ์ (Schuster และคณะ, 1998) ดังรูปที่ 2.10 ได้แก่

(1) การเจริญในสภาวะปกติ (Vegetative cell) จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rods shape) ซึ่งอาจจะพบในลักษณะที่เป็นเซลล์เดียว (Single cell) หรืออยู่กันเป็นคู่ (Pair) ตลอดจนอยู่เรียงกันเป็นสายโซ่ยาวก็ได้

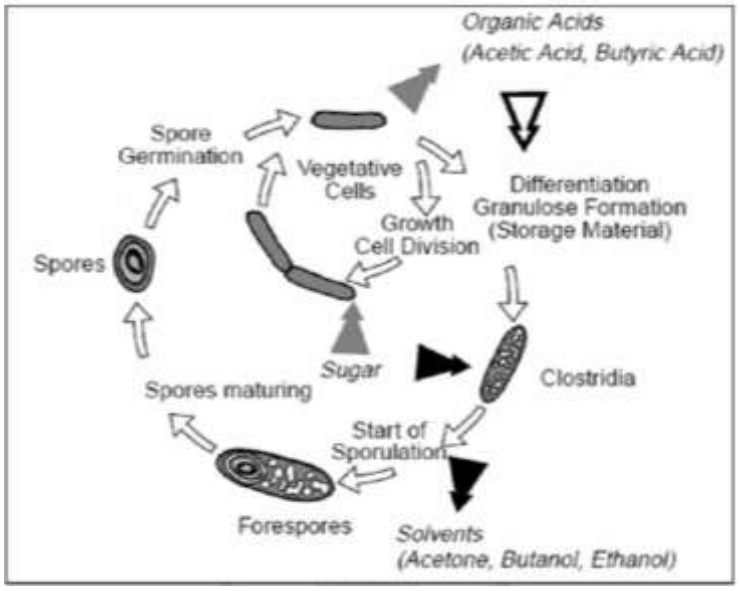
(2) รูปร่างแบบคลอสติเดีย (Clostridia) เซลล์จะมีลักษณะคล้ายกระบอกยาสูบ (Cigar shape) การเจริญในขั้นนี้ เซลล์จะมีการสร้างสารพวก Granulose สะสมภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการพองขึ้น

(3) Forespores จะเกิดขึ้นในกรณีที่สภาวะแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ส่งผลให้เซลล์เริ่มมีการสร้าง Forespores และจะถูกพัฒนาเป็นสปอร์ต่อไป

(4) รูปแบบสปอร์ (Spore) เป็นขั้นที่เซลล์สร้างโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ต่อได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม



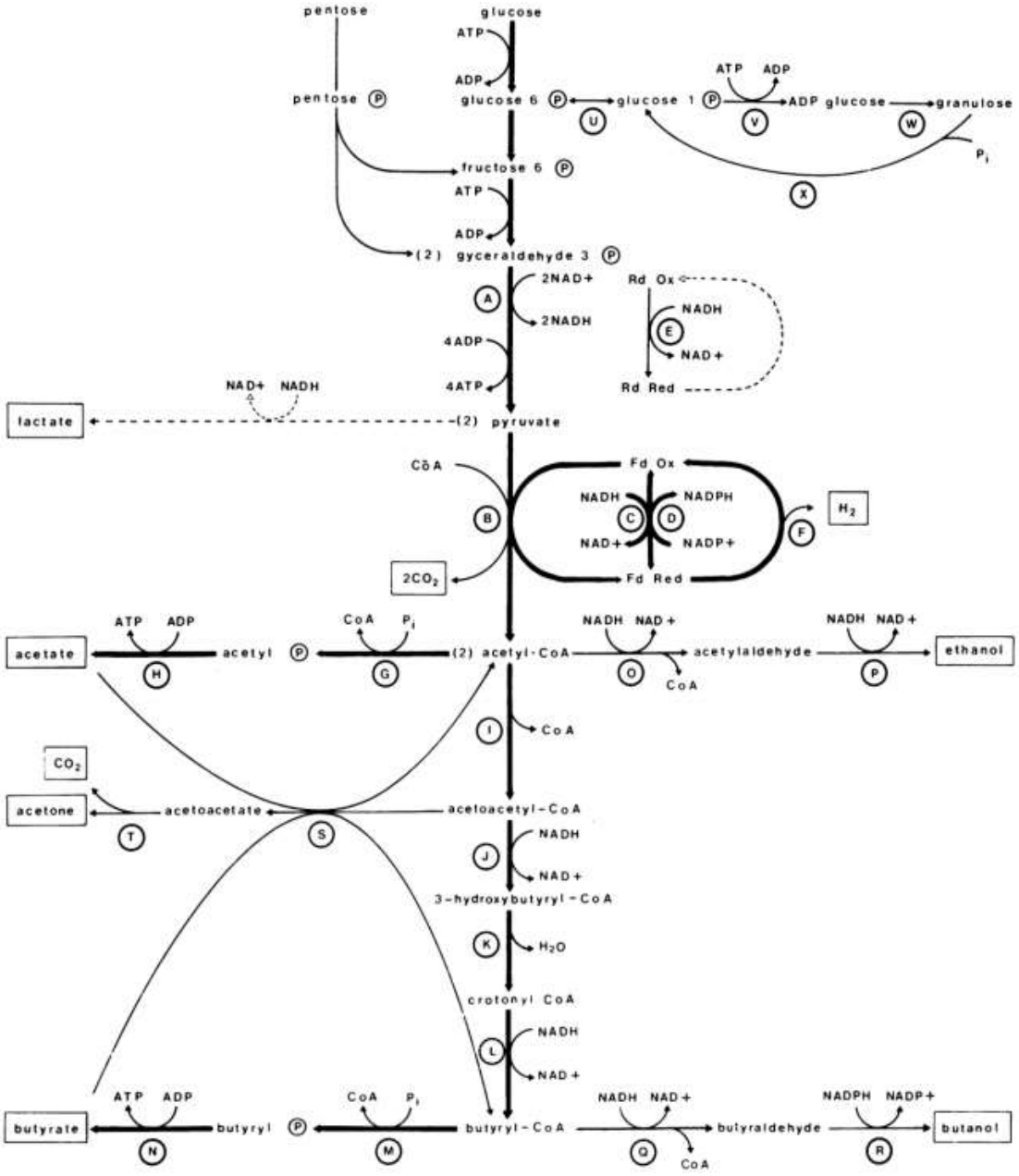
รูปที่ 2.9 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope; SEM) (A) เซลล์ปกติ (Vegetative cells) (B) สปอร์ (Spore formed cells)
ที่มา : สุนทร และคณะ (2555)



รูปที่ 2.10 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum*
ที่มา : Schuster และคณะ (1998)

2.3.2 ชีวเคมีของกระบวนการหมัก (Biochemistry of fermentation)

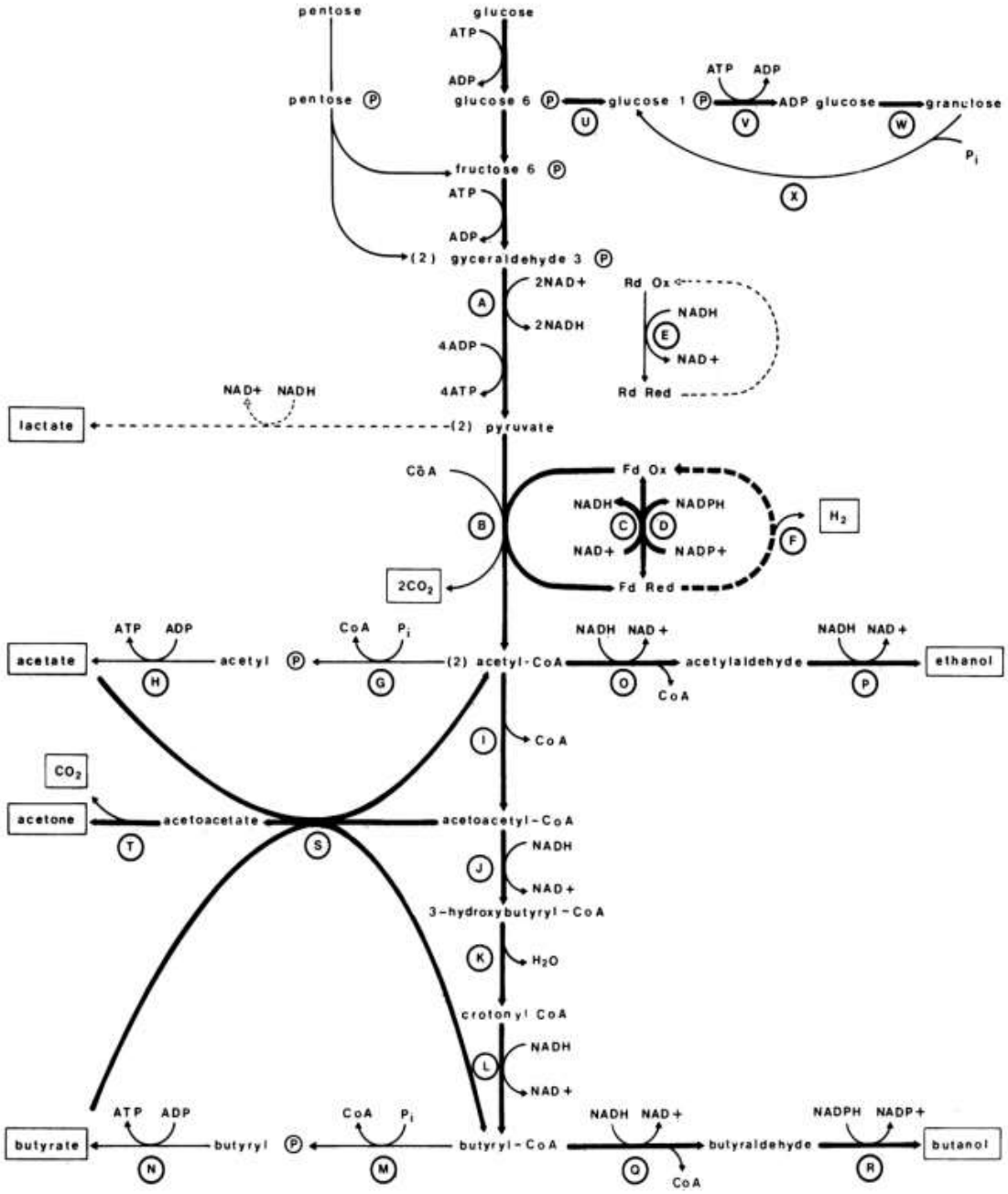
รูปแบบของการหมักแบบกะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ ได้แก่ ระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) และระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase) ซึ่งวิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุพันธ์ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต ให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.11ก และ 2.11ข ทั้งนี้ น้ำตาลในกลุ่มเฮกโซส (C6) จะถูกดึงเข้าสู่วิถีของ Embden – Meyerhof – Parnas glycolytic pathway (EMP pathway) ในระหว่างเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก โดยน้ำตาล 1 โมเลกุล จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกได้ 2 โมเลกุล พร้อมกับมีการปลดปล่อยพลังงาน ATP อีก 2 โมเลกุล และ $NADH^+$ H^+ จำนวน 2 โมเลกุลด้วย ส่วนน้ำตาลเพนโตส (C5) จะถูก metabolized ด้วยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) และเกิดการสร้างสาร Fructose-6-phosphate และ Glycoceraldehyde-3-phosphate ตามลำดับ ก่อนจะเข้าสู่วิถี EMP ต่อไป กรดไพรูวิกที่สร้างขึ้นจากวิถี EMP จะถูกเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA คาร์บอนไดออกไซด์ และ Reduce feredoxin โดยเอนไซม์ Pyruvateferredoxin oxidoreductase ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Coenzyme A (CoA) ทั้งนี้ Acetyl-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของทุกการสร้างผลผลิตในกระบวนการหมัก โดยที่ Acetyl - CoA 2 โมเลกุล นั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งต่อมาจะถูกใช้ในการสร้างกรดบิวทิริก โดยจะทำให้ค่าพีเอช ของน้ำหมักลดลงในช่วงนี้ นอกจากนี้ Acetoacetyl-CoA ยังถูกใช้เพื่อสร้าง Acetate ด้วยซึ่งต่อมา Acetate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตนและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ในระบบ Acetoacetate decarboxylase ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่กลับไม่ได้ ทั้งนี้กลไกการผลิตอะซิโตนนั้น เพื่อป้องกันการผลิตกรดบิวทิริกในปริมาณที่เป็นพิษ และช่วยกำจัด 2 ปฏิกิริยาที่สร้าง NAD^+ ด้วย ซึ่งถ้าต้องการสร้าง NAD^+ แบคทีเรียจะมีกลไกในการเปลี่ยน Butyrate กลับไปเป็น Butyryl-CoA แล้ว Butyryl-CoA จะถูกลดรูปเป็นบิวทานอลต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่าการผลิตบิวทานอลจะมากกว่าการผลิตเอทานอลและแก๊สไฮโดรเจนอย่างมาก สำหรับเอทานอล จะถูกสร้างจาก Acetoacetyl-CoA เช่นกัน ผ่าน 2 ปฏิกิริยา โดยเริ่มจาก Acetoacetyl-CoA ถูกเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde โดยเอนไซม์ Acetaldehyde dehydrogenase ก่อนที่ Acetaldehyde จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์ Ethanol dehydrogenase พร้อมกับการใช้ $NADH^+$ H^+ ถึง 2 โมเลกุลเพื่อสร้าง NAD^+ ด้วย (สุนทร และคณะ, 2555)



(ก)

รูปที่ 2.11 วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. (ก) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) (ข) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดบางเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

ที่มา : สุนทร และคณะ (2555)



(ข)

รูปที่ 2.11 (ต่อ) วิถีทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Clostridium* spp. (ก) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenic phase) (ข) ปฏิกิริยาที่แสดงด้วยลูกศรชนิดหนาเกิดในระยะของการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ (Solventogenic phase)

ที่มา : สุนทร และคณะ (2555)

เอนไซม์ต่างๆ แสดงตามตัวอักษร: (A) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; (B) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (C) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (D)

NADPH ferredoxin oxidoreductase; (E) NADH rubredoxin oxidoreductase; (F) hydrogenase; (G) phosphateacetyltransferase (phosphotransacetylase); (H) acetate kinase; (i) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase); (J) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (K) crotonase; (L) butyryl-CoA dehydrogenase; (M) phosphate butyltransferase (phosphotransbutyrylase); (N) butyrate kinase; (O) acetaldehyde dehydrogenase; (P) ethanol dehydrogenase; (Q) butyraldehyde dehydrogenase; (R) butanol dehydrogenase; (S) acetoacetyl-CoA:acetate/butyrate:CoA transferase; (T) acetoacetate decarboxylase; (U) phosphoglucomutase; (V) ADP-glucose pyrophosphorylase; (W) granulose (glycogen) synthase; (X) granulose phosphorylase
ที่มา : สุนทร และคณะ (2555)

2.4 การย่อยเซลลูโลส (Hydrolysis)

กระบวนการย่อยพื้นฐานจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส แบ่งออกเป็น 2 วิธี (Parisi, 1989) ได้แก่

2.4.1 การไฮโดรไลซิสด้วยกรด

การไฮโดรไลซิสด้วยกรด สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจาง และการไฮโดรไลซิสด้วยกรดเข้มข้น

(1) การใช้กรดเจือจาง จะใช้อุณหภูมิและความดันสูง ระยะเวลาของปฏิกิริยาจะเป็นวินาที หรือนาที เหมาะต่อกระบวนการแบบต่อเนื่อง การใช้กรดร่วมกับอุณหภูมิและความดันสูงจำเป็นต้องใช้วัสดุพิเศษสำหรับสร้างถังปฏิกรณ์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง

(2) การใช้กรดเข้มข้น กระบวนการนี้จะใช้อุณหภูมิต่ำ และจะมีการใช้ความดันเฉพาะเมื่อต้องการปั๊มส่งถ่ายของจากถังหนึ่งไปยังอีกถังหนึ่ง

2.4.2 การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์

เซลลูโลสตามธรรมชาติ ส่วนมากเกิดการสลายตัวจากการย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งพบทั่วไปในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบมากในเชื้อรา เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น เพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ โดยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่ออยู่ในสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วถึง 10^{8}-10^{11} เท่าเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะ (Specificity) ต่อปฏิกิริยาหนึ่งๆ เท่านั้น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง และแม้ว่าเอนไซม์จะถูกสร้างอยู่ภายในเซลล์ แต่ก็สามารถสกัดออกมาใช้งานได้เช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในเซลล์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์

และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551) เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ที่นิยมนำมาใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ แบคทีเรีย *Trichoderma reessi* โดยเอนไซม์เซลลูเลสมีสมบัติเป็น Multicomponent enzyme ซึ่งมีองค์ประกอบของเอนไซม์ 3 ชนิดทำงานร่วมกันแบบ Synergisticaction ดังนี้ (ลลิดา, 2541)

(1) เอ็นโดกลูคาเนส (Endoglucanase, Cx)

ทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1, 4 ภายในสายเซลลูโลสตรงบริเวณโครงสร้างอะมอร์ฟัสอย่างสุ่ม (Randomly acting) ทำให้เกิดปลายอิสระขึ้น ซึ่งจะได้เซลโลไบโอส, โอลิโกเซลลูโลส และกลูโคสในปริมาณที่น้อยมาก

(2) เอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanase, C1)

ทำหน้าที่ย่อยสลายโอลิโกแซคคาไรด์ และยังย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลายรีดิวซ์ (Reducing End) ของสายโซ่เซลลูโลส

(3) เบต้า-กลูโคสิเดส (β-glucosidase, Cb)

ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส ซึ่งเบต้า-กลูโคสิเดส จะเป็นตัวช่วยส่งเสริมการทำงานของเอ็นโดกลูคาเนส และเอ็กโซกลูคาเนส ทำให้ย่อยสลายได้กลูโคสมากขึ้น การย่อยสลายเซลลูโลสจะได้ปริมาณกลูโคสมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับสัดส่วนของเบต้า-กลูโคสิเดสในเซลลูเลสว่าจะมีมากหรือน้อย ดังนั้นเอนไซม์ตัวนี้จึงเป็นกุญแจสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส

องค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan และคณะ, 1987) ประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ (Complex enzyme) ที่ทำงานร่วมกัน คือ

(1) เอนไซม์ C1 หรือ Hydrogen bondase

ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสรูปที่เหมาะสม คือ ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนลง เพื่อเป็นสารตั้งต้นของเซลลูเลส (Fan และคณะ, 1987)

(2) เอนไซม์ Cx หรือ β-1,4 Glucanase

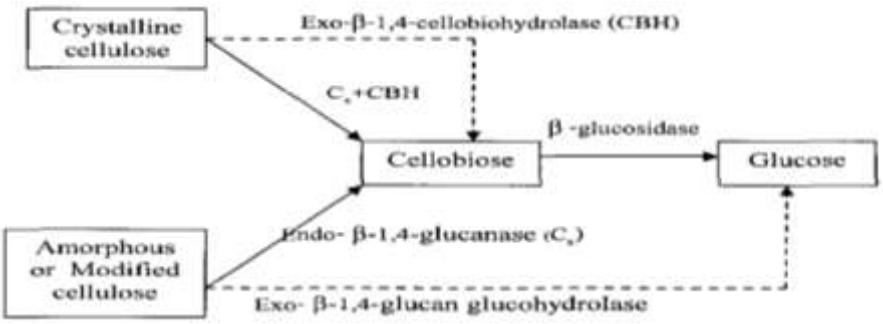
เป็นเซลลูเลสที่ย่อยสลายพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ กลุ่มนี้มี 3 ชนิด คือ (Fan และคณะ, 1987)

(2.1) Endo-β-glucanase (β-D-glucan glucanohydrolase, EC.3.2.1.4) จะทำหน้าที่ย่อย β-1,4-glycosidic linkage แบบสุ่ม ผลจากการย่อยทำให้สายโมเลกุลของเซลลูโลสสั้นลงอย่างรวดเร็ว ขณะที่หมู่รีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ได้ผลผลิตคือ กลูโคส และ Cellotriose เอนไซม์นี้ไม่ย่อย Cellobiose แต่ย่อย Cellodextrin เซลลูโลสที่เกิดการพองตัว Carboxy methyl cellulose (CMC) และ Hydroxyl-ethyl cellulose (HEC)ได้ และปฏิกิริยาจะลดลงเมื่อสายโมเลกุลเซลลูโลสสั้นลง ในการตรวจสอบเอนไซม์นี้จะใช้ CMC และ HEC เป็นสารตั้งต้น (Fan และคณะ, 1987)

(2.2) Exo-β-glucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, EC.3.2.3.91) หรือ cellobiohydrolase ทำหน้าที่ย่อยเซลลูโลสด้าน non-reducing end เอนไซม์นี้สามารถย่อยเซลลูโลสในรูปผลึก (Crystalline cellulose) หรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble cellulose) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Cellodextrin และ Cellobiose สามารถตรวจสอบเอนไซม์นี้โดยการใช้ฝ้ายอวิเซล (Avicel) และ Amorphous cellulose เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามการทำงานของเอนไซม์จะลดลงเมื่อขนาดของสารตั้งต้นสั้นลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ endoglucanase ผสมอยู่ (Fan และคณะ, 1987)

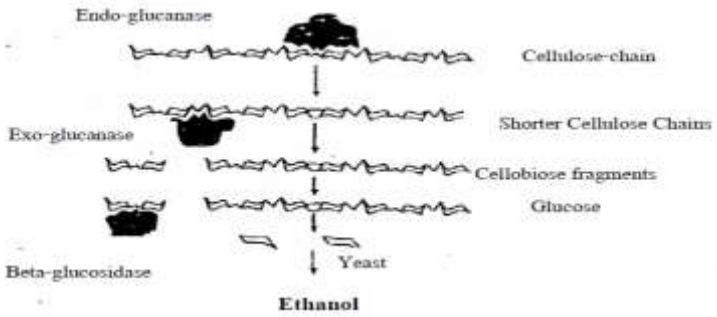
(2.3) β-glucosidase (β-D-glucohydrolase EC.3.2.1.21) ทำหน้าที่ย่อย Cellobiose และ Cello-oligosaccharide ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสหรือ cellodextrin ได้ทดสอบเอนไซม์นี้โดยใช้ Cellobiose, *p*-nitrophynyl-β-d-glucoside หรือ Salicin เป็นสารตั้งต้นการย่อยสลายสารตั้งต้นโดยเซลลูเลส (Fan และคณะ, 1987)

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็น Prohydrolytic step คือสายโซ่Anhydroglucose จะถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สองเกิด Hydrolytic cleavage ของสายโพลีเมอร์ กลไกการทำงานเริ่มจากเซลลูโลสจะเกิดบวมตัว (Swelling) พร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Endoglucanase และ Exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระ ส่วน exoglucanase จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลายซึ่งถูกย่อยสลายต่อไปโดย β-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ ดังรูปที่ 2.12



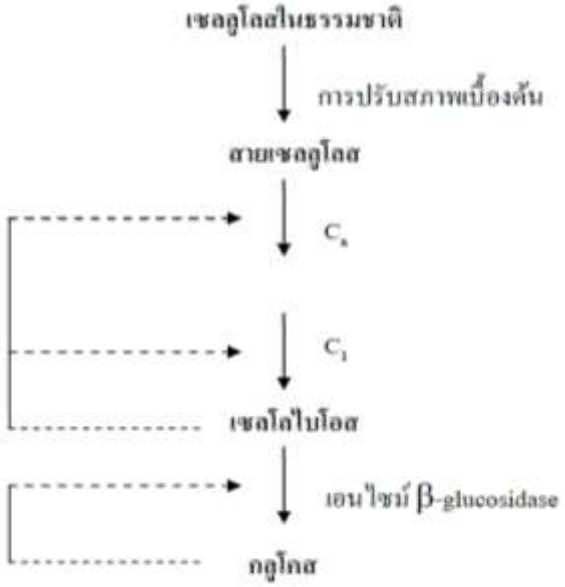
รูปที่ 2.12 กลไลการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสของระบบเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา : Fan และ Lee (1983)

การย่อยสลายเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์นั้น จะเกิดขึ้นเมื่อมีเซลลูโลส เซลโลไบโอส หรือโพลีแซคคาไรด์อื่นที่มีโมเลกุลของกลูโคสประกอบอยู่เป็นตัวกระตุ้น (Inducer) โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ Cx และ C1 ซึ่งเป็น Extracellular enzymes ขับออกมานอกเซลล์ และย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง จนสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ หลังจากนั้นเอนไซม์ Cb ซึ่งเป็น Intracellular enzyme จึงเข้าทำการย่อยสลายเซลโลไบโอสให้เป็นกลูโคส โดยกลไกการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสและตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยา ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 กลไกการทำงานและตำแหน่งที่เอนไซม์ชนิดต่างๆเข้าทำปฏิกิริยา
ที่มา : ฉัตรชัย (2552)

การทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นดังนี้ β-glucosidase จะถูกยับยั้งด้วยปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลยับยั้งต่อเนื่องคือ ทำให้มีการสะสมของเซลโลไบโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Endoglucanase และ Exoglucannase ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงและยุติในที่สุด ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 การย่อยและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส
ที่มา: พรรณวิไล (2545)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ประกอบด้วย

(1) อุณหภูมิ (Temperature)

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน (Optimum temperature) ซึ่งหากอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เนื่องจากเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (Denaturation) หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสรูปที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Fan และคณะ, 1987)

(2) ค่าความเป็นกรดด่าง

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างค่าหนึ่ง เรียกว่า ค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum pH) ซึ่ง ณ จุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง มีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์จะลดลง โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง ระหว่าง 5.0-9.0 (Fan และคณะ, 1987)

(3) ความเข้มข้นของซับสเตรท (Substrate)

เมื่อความเข้มข้นของซับสเตรท เพิ่มขึ้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก และลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรทสูงขึ้น จนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก (Fan และคณะ, 1987)

(4) ปริมาณเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาดำเนินไปจนถึงจุดสูงสุด พบว่า อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะมีค่าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ (Fan และคณะ, 1987)

(5) ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme Inhibitor)

เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท และลักษณะของหมู่ฟังก์ชัน ที่บริเวณ Active side ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ปัจจัยที่มีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนจึงมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ด้วย เช่น ความร้อน สภาพความเป็นกรด-ด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ ยูเรีย ความร้อนหรือรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นต้น

นอกจากนี้สมบัติของซับสเตรทที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Fan และคณะ, 1987) ประกอบด้วย

(1) ความเป็นผลึก เมื่อเป็นมากทำให้การย่อยเกิดได้ยากขึ้น

(2) พื้นที่ผิวสัมผัส ถ้าพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรทมีมาก โอกาสที่เกิดปฏิกิริยาจะมากขึ้นตามด้วยเช่นกัน

(3) ปริมาณลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบส่งผลให้เกิดการย่อยได้ยากขึ้น

(4) องศาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชั่น โมเลกุลของเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นใยที่แข็งแรง เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนยึดอยู่จึงถูกย่อยได้ยาก ดังนั้นการเพิ่มองศาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชั่นจะทำให้เส้นใยมีความแข็งแรงมากขึ้นกว่าเดิม จึงถูกย่อยได้ยากขึ้นเนื่องจากการนำเอนไซม์มาใช้มีข้อดี ข้อเสีย และข้อจำกัดหลายอย่าง ดังนั้นในระบบที่มีการใช้เอนไซม์จะต้องออกแบบให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่จะนำไปหมักต่อไป

เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาจมีคุณสมบัติเหมือนหรือต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ โครงสร้างของเอนไซม์ ชนิดและแหล่งที่มาของจุลินทรีย์

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลส (Fan และคณะ, 1987) ประกอบด้วย

(1) น้ำหนักโมเลกุล เอนไซม์เซลลูเลสจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ผลิต

(2) อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

(2.1) อุณหภูมิที่เหมาะสม และความเสถียร เอนไซม์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยามีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่ง เรียกว่า ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าจุดนี้ ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะช้าลง เพราะเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ หรืออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา เอนไซม์เซลลูเลสจะเกิดการเสียสรูปที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส

(2.2) ค่าความเป็นกรดด่าง ที่เหมาะสม และความเสถียร การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อค่าความเป็นกรดด่าง เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อาจทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ เนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์มีการแตกตัวตรงหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิล หรือ Side chain ได้ต่างกัน ในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกันจะมีผลให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าหนึ่ง เรียกว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงาน ณ จุดที่ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่านี้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำงานได้ดีที่สุดในค่าความเป็นกรดด่าง ช่วง 5.0 - 9.0 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและลดช้าลงเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้นจนในที่สุดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

(3) ผลของอิออนโลหะและสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibitor) เป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการอธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น และลักษณะของ Functional group ที่บริเวณ Active site ทำให้เข้าใจและสามารถควบคุมกระบวนการที่เกิดขึ้นได้

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบผลดีและผลเสียในการย่อยด้วยเอนไซม์ กับการย่อยด้วยกรด และด่าง

ผลดี	ผลเสีย
ก. สภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างไม่รุนแรง ข. ปฏิกิริยามีความจำเพาะ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง ค. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น ง. สามารถทำการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้ จ. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	ก. วัตถุดิบต้องได้รับการปรับสภาพก่อน ข. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ สามารถเป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ (product inhibition) ค. สูญเสียเอนไซม์ไป เนื่องจากถูกดูดซับ (adsorbed) บนวัสดุที่ไม่ย่อย ง. เสื่องต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์ จ. ถ้าระบบมีสารที่เป็นตัวขัดขวางปฏิกิริยา เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน อัตราปฏิกิริยาจะลดลง

ที่มา : ฉัตรชัย (2552)

2.5 การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการย่อย (Pretreatment)

เซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นจะอยู่ในรูปที่เป็นผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) กับลิกนิน และเฮมิเซลลูโลส แต่ส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ดังนั้นขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อน เนื่องจากส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง อีกทั้งลิกนินในปริมาณมากจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควรและยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิต คือ เพื่อแยกลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยวิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธี (ดังรูปที่ 2.17) คือ

(1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical Pretreatment)

เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด หรือการใช้ความร้อน

(2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical Pretreatment)

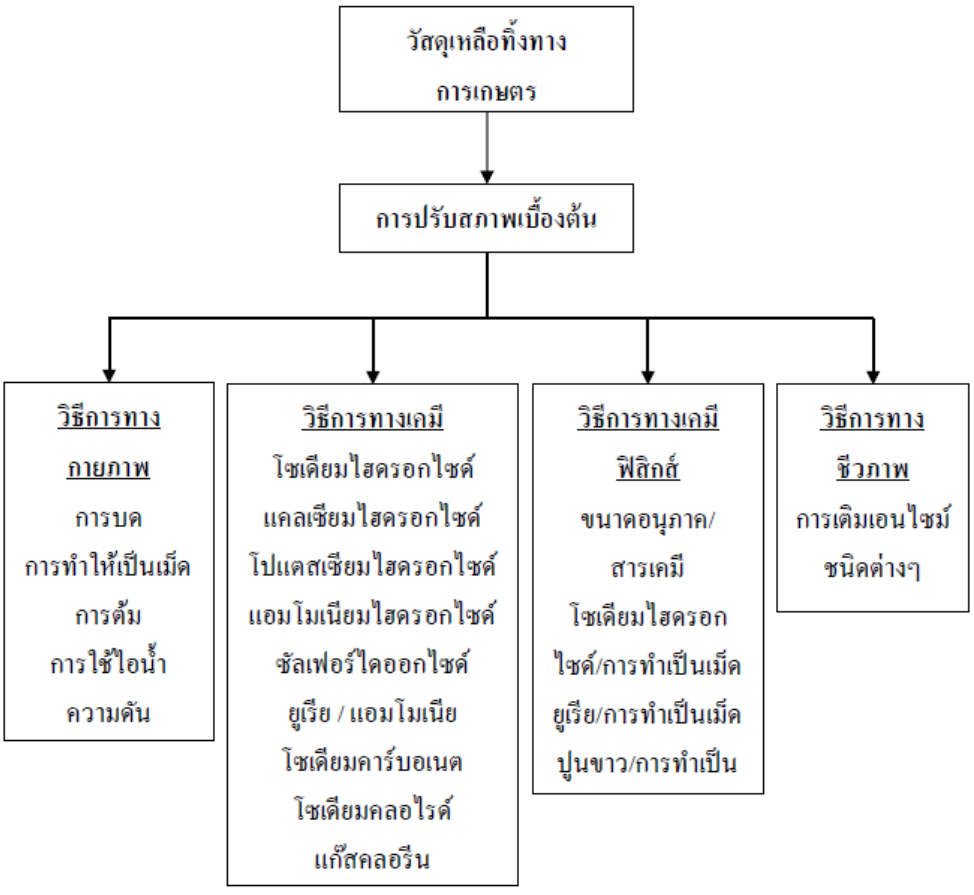
เป็นการใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน หรืออาจใช้สารละลายแอมโมเนียเพื่อกำจัดลิกนิน

(3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (Physico-chemical Pretreatment)

เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับความร้อน

(4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological Pretreatment)

เป็นการใช้เอนไซม์จาก จุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก



รูปที่ 2.15 วิธีการปรับสภาพวัตถุดิบ
ที่มา : พรรณวิไล (2545)

การเตรียมเซลลูโลส (Pretreatment) มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลส รวมทั้งลดการเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการเป็นรูพรุนของวัตถุดิบการปรับสภาพต้องทำ เพราะว่าสารพวกลิกโนเซลลูโลสเป็นสารที่มีความแข็งแรง และยากต่อการย่อยสลาย จึงจำเป็นต้องมีการเตรียมการให้อ่อนนุ่มลง เพื่อให้เอนไซม์เข้าถึงและทำปฏิกิริยาได้ดี (จีอีอี เมเนจเม้นท์ จำกัด, 2555)

2.5.1 วิธีการเตรียมทางกายภาพ (Physical pretreatment)

(1) Machanical Comminution

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

(2) Pyrolysis

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

2.5.2 วิธีการเตรียมทางเคมีกายภาพ (Physico-Chemical pretreatment)

(1) Steam explosion (astohydrolysis)

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

(2) Ammonia fiber explosion (AFEX)

เป็นการนำวัตถุดิบใส่ในสารละลายแอมโมเนียที่อุณหภูมิสูงและความดันสูงจากนั้นลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะคล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำ ใช้แอมโมเนีย 1-2 กิโลกรัมต่อวัตถุดิบ 1 กิโลกรัม

อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สามารถใช้กับฟางข้าว ซังข้าวโพด หญ้า พืชตระกูลถั่ว เป็นต้น (Sun และ Cheng, 2002)

(3) CO_2 explosion

คล้ายกับการระเบิดด้วยไอน้ำและการระเบิดด้วยแอมโมเนีย โดย CO_2 จะเหมือนกับกรดคาร์บอนิก สำหรับพืชตระกูลถั่วใช้ 1 กิโลกรัม CO_2 ต่อไฟเบอร์ 1 กิโลกรัม ความดัน 5.62 มิลลิปาสคาล และไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ได้กลูโคสร้อยละ 75 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (Sun และ Cheng, 2002)

2.5.3 วิธีการเตรียมทางเคมี (Chemical pretreatment)

(1) Ozonolysis

โอโซนสามารถสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในวัตถุดิบได้หลายชนิด แต่ไม่สลายเซลลูโลส ไม่ผลิตสารที่เป็นพิษ ปฏิกิริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิและความดันปกติ มีข้อด้อยคือมีราคาแพง (Sun และ Cheng, 2002)

(2) Acid pretreatment

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

(3) Alkaline pretreatment

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

(4) Oxidative delignification

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

2.5.4 วิธีการเตรียมทางชีวภาพ (Biodegradation pretreatment)

ในการเตรียมลิกโนเซลลูโลสด้วยวิธีการเตรียมทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ เช่น ราผุสีขาว-น้ำตาล และราผุอ่อน ในการสลายลิกนินและเซลลูโลส โดย ราผุสีขาว สามารถสลายลิกนินแล้วปล่อยเซลลูโลสออกมา ราผุสีน้ำตาล สามารถสลายเซลลูโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส และยีสต์จะหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลต่อไป (Sun และ Cheng, 2002)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จิรกานต์ และคณะ (2536) ได้มีการศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมในกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้เชื้อ *Clostridium butylicum* NRRL B592 และเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 เปรียบเทียบระหว่างมันสำปะหลังสด มันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ แป้งมันสำปะหลัง และผักตบชวาที่ย่อยด้วยกรด ผลจากการทดลองพบว่าการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดที่ค่าน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณบิวทานอลสูงสุด (11.1-11.3 กรัมต่อลิตร) การเพิ่มผลผลิตสามารถทำโดยการพัฒนากระบวนการผลิต จากการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลแบบต่อเนื่องที่มีการนำเซลล์เวียนกลับมาใช้ใหม่ สามารถทำให้อัตราการผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 20 เท่า ของการเพาะเลี้ยงแบบกะ และ 4.6 เท่าของการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

สถิดา (2536) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ในการเพิ่มอัตราการผลิตตัวทำละลายในกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยศึกษาที่ระดับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.8 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการผลิตตัวทำละลายสูงสุดอยู่ที่ 0.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

อิสรี (2550) ได้พบว่ากากตะกอนเยื่อกระดาษเป็นชีวมวลประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก เป็นเซลลูโลส 51 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 39 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 7 เปอร์เซ็นต์ (ของน้ำหนักแห้ง) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอล แต่จำเป็นต้องทำการปรับสภาพขั้นต้นก่อนเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล ในการปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษขั้นต้นด้วยกรดเจือจาง สภาวะที่เหมาะสมคือการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ใช้ในการปรับสภาพ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาผ่านกระบวนการย่อยเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (ที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อุณหภูมิ 50องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง) เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 76.05 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษและเมื่อนำมาหมักโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เกิดเป็นเอทานอล 21.50 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 60 ชั่วโมง คิดเป็น

ประสิทธิภาพการหมัก 70.59 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการลดความเป็นพิษโดยเติมด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงไปพบว่าทำให้เกิดเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 27.55 มิลลิกรัมต่อกรัมเยื่อกระดาษ โดยเกิดเอทานอลสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 40 ชั่วโมง คิดเป็นประสิทธิภาพการหมัก 88.24 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการลดความเป็นพิษโดยการใช้ด่างจึงเป็นการเพิ่มปริมาณเอทานอลและช่วยลดระยะเวลาในการหมักลง

จากการศึกษาของ Gu และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่เสริมด้วยแอมโมเนียมอะซิเตต ในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย *C. acetobutylicum* EA 2018 ซึ่งพบว่าการใช้วัตถุดิบดังกล่าวมีผลทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ ทั้งกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในช่วงแรก ก่อนจะถูกใช้ไปอย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะพบการผลิตบิวทานอลและอะซิโตนเป็นส่วนมาก และมีการผลิตเอทานอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในปี 2010 Thang และผู้ร่วมวิจัย ได้รายงานความสามารถของแบคทีเรีย *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยแป้งได้ในปริมาณมาก โดยในการศึกษานี้ ใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ กลุ่มนักวิจัยพบว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยแบคทีเรีย ให้ผลเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลกลูโคสเลย ซึ่งสามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงถึง 20-21 กรัมต่อลิตรและให้ค่าผลผลิตทั้งหมด 41-46 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้แป้งข้าวโพดและแป้งมันฝรั่งในการศึกษาที่ผ่านมา (Nimcevic และคณะ, 1998; Ezeji และคณะ, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าผลผลิตที่ได้ยังสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* P262 อย่างมาก ซึ่งให้ค่าผลผลิตที่ได้เพียง 20- 34 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

Abd-Alla และคณะ (2012) ศึกษาการใช้ผลอินทผลัมที่เน่าเสีย (*Pheonix dactylifera* L.) เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (acetone-butanol-ethanol, ABE) โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมของ *C. acetobutylicum* ATCC 824 และ *Bacillus subtilis* DSM 4451 โดย *B. subtilis* จะช่วยในการใช้ออกซิเจนจนหมด และรักษาสภาพไร้ออกซิเจนอย่างแท้จริงเพื่อการผลิต ABE โดย *C. acetobutylicum* ซึ่งไม่ต้องการอากาศในการเจริญ ผลอินทผลัมที่เน่าเสียปั่น 75 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต ABE ได้ทั้งหมด 21.56 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตสูงสุดของ ABE เท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลได้ของ ABE เท่ากับ 0.42 โดยการเพาะเลี้ยงแบบผสมโดยไม่ต้องเติมตัวรีดิวซ์และแก๊สไนโตรเจน มีการเติมสารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร หรือแอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้น 1.6 กรัมต่อลิตร กับผลอินทผลัมที่เน่าเสียปั่น เป็นการเพิ่มการผลิต ABE อย่างมีนัยสำคัญ การรวมกันของสารสกัดยีสต์ และแอมโมเนียมไนเตรททำให้การผลิต ABE เพิ่มขึ้น ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่าผลอินทผลัมที่เน่าเสียมีประสิทธิภาพในการใช้ผลิต ABE ได้ในทางการค้า การไม่ต้องเติมตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ที่มีราคาแพงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือเติมแก๊สไนโตรเจน วิธีการนี้จะทำให้การหมักจุลินทรีย์แบบไร้ออกซิเจนของผลอินทผลัมปั่นประหยัดมากขึ้น และลดทุนการผลิต ABE

Kai และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาการผลิต ABE จากการย่อยซังข้าวโพด เพื่อทำการเพาะเลี้ยง *Clostridium saccharobutylicum DSM* 13864 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ในการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนการปรับสภาพเพื่อกำจัดลิกนินและล้างซังข้าวโพด จะมีค่าผลได้ของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด เท่ากับ 917 กรัมต่อกิโลกรัม และนำสารที่ได้จากการย่อยที่ไม่แยกตะกอนออกมาเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต ABE โดยมีปริมาณน้ำตาล 55.22 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ตัวทำละลาย เท่ากับ 19.44 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณบิวทานอลอยู่ถึง 12.27 กรัมต่อลิตร โดยจะคิดเป็นค่าผลได้ของ ABE เท่ากับ 350 กรัมต่อกิโลกรัม และค่าอัตราการผลิต เท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมการทดลองเป็นการใช้น้ำตาลหลายชนิดปริมาณ 55.22 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณ ABE เท่ากับ 16.81 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณบิวทานอลถึง 10.26 กรัมต่อลิตร โดยค่าผลได้ของ ABE จะเท่ากับ 300 กรัมต่อกิโลกรัม และอัตราการผลิต เท่ากับ 0.47 กรัมต่อกิโลกรัม แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยวัตถุดิบอาจจะเป็นสารกระตุ้นองค์ประกอบเพื่อช่วยปรับปรุงการผลิต ABE

Lijuan และคณะ (2015) ได้ศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อยด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ในสภาวะที่เหมาะสมทั้งความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ระยะเวลา อุณหภูมิ และอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบและสารละลาย (SLR) โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพก่อนการย่อย คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 10 โดยทำการบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลของการปรับสภาพก่อนการย่อยนี้จะมีปริมาณเซลลูโลสอย่างมีนัยสำคัญ 94.56 เปอร์เซ็นต์ และเฮมิเซลลูโลส 81.47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลิกนินที่กำจัดออกมีถึง 46.79 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตไปย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 8.39 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์อีก 12 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่ทำการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น 1.44 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการปรับสภาพ และมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นถึง 1.29 เท่า เมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด และเมื่อทำการวิเคราะห์ และประเมินลักษณะทางกายภาพทั้งผลึก และโครงสร้างของซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope; SEM) เครื่องเอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray Diffractrometer; XRD) เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโทรมิเตอร์ (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer; FTIR) ซึ่งกระบวนการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตนี้เป็นกระบวนการใหม่ โดยเป็นกระบวนการที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เนื่องจากส่งผลต่อองค์ประกอบและลักษณะโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ คือ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยเก็บกล้าเชื้อในอาหาร Difco™ Reinforced Clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์

3.1.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)
เปปโตน
กรดอะมิโนซิสเทอีน-กรดไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
โซเดียมอะซีเตต (Sodium acetate)
ผงวุ้น (Agar)
น้ำตาลกลูโคส
เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
เรซาซูลิน (Resazurin)
อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.1.3 อุปกรณ์

กระบอกตวง
ขวดน้ำกลั่น
ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ
ขวดเก็บตัวอย่าง
แอนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
โถดูดความชื้น
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ขวดรูปชมพู่	ตู้เย็น
บีกเกอร์	ตู้อบลมร้อน
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	ตู้ปลอดเชื้อ
ตะเกียงแอลกอฮอล์	Anaerobic chamber
ลวดเขี่ยเชื้อ	เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
ช้อนตักสาร	เครื่องปั่นเหวี่ยง
แท่งแก้วคนสาร	เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
หลอดทดลอง	ถังก๊าซไนโตรเจนและก๊าซผสม
ปิเปต	เครื่องบดอุตสาหกรรม
ลูกยางดูดสาร	หม้อนึ่งอัดไอน้ำ
หลอดปั่นเหวี่ยง	แผ่นดูดออกซิเจน (Anaerobic cult)
จุกสำลี	ออโต้ปิเปตต์
ตระแกรงร่อน เบอร์ 50	คิวเวต

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography)

3.1.4 ซังข้าวโพด

สารตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณปิยะพร เล็กวัฒนะ โดยการนำซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ (ไม่ทราบชนิดและสายพันธุ์) มาจากโรงงานปิยะพร ที่ตั้งอยู่ในอำเภออรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว ซึ่งจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และเป็นวัสดุที่ยังไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ โดยเป็นซังข้าวโพดที่ผ่านการกระเทาะเมล็ด และทำการตากแห้งแล้ว

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

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

โดยละลายส่วนผสมปริมาณ 38 กรัม เข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และทำการปรับปริมาตรของอาหาร RCM ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2.2 อาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine ; GYCC) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยดัดแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Badr และคณะ (2000) ซึ่งมีส่วนผสม ดังต่อไปนี้

น้ำตาลกลูโคส	50.0	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5.0	กรัมต่อลิตร
เคซีน ไฮโดรไลเซต (Casein hydrolysate)	15.0	กรัมต่อลิตร
กรดอะมิโนซิสเทอีน-ไฮโดรคลอริก (cysteine-HCl)	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.5	กรัมต่อลิตร
เรซาซูลิน (Resazurin)	0.001	กรัมต่อลิตร

โดยละลายส่วนผสมเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น และทำการปรับปริมาตรของอาหาร GYCC ให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการนึ่งฆ่าเชื้อสารละลายน้ำตาลแยกสารส่วนประกอบอาหารอื่นๆ และหากใช้ซังข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น จะใช้สารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

ทำชุดควบคุมโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งและไม่มีออกซิเจน ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 50 กรัมต่อลิตร

3.3 การเตรียมซังข้าวโพด

สารตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ที่นำมาจากโรงงานผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์ อำเภออรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นซังข้าวโพดที่ผ่านการตากแห้งแล้ว โดยจะนำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดอุตสาหกรรม และนำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนเบอร์ 50 (ขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร)

3.4 การปรับสภาพซังข้าวโพด

สารตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ที่นำมาบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด

อุตสาหกรรม และนำมาร่อนด้วยตะแกรงร่อนเบอร์ 50 (ขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร) เพื่อนำไปทำการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ จึงต้องทำการปรับสภาพก่อนทำการ โดยทำการทดลองในการปรับสภาพโดยใช้น้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3.4.1 การปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

นำผงซังข้าวโพด มาทำการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 โดยใช้อัตราส่วนผงซังข้าวโพดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนึ่งอัดไอน้ำ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และหากสารละลายยังไม่ใส นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

ซึ่งของเหลวที่กรองได้นั้น หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic colorimetric method (DNS) (หัวข้อที่ 3.8.3.1)

3.4.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรด

นำผงซังข้าวโพด มาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนผงซังข้าวโพดต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และหากสารละลายยังไม่ใส นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

ซึ่งของเหลวที่กรองได้นั้น หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (หัวข้อที่ 3.8.3.1)

3.4.3 การปรับสภาพด้วยสารละลายเบส

นำผงซังข้าวโพด มาทำการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ โดยใช้อัตราส่วนผงซังข้าวโพดต่อสารละลายเบสเท่ากับ 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องหม้อนึ่งอัดไอน้ำ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง และหากสารละลายยังไม่ใส นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

ซึ่งของเหลวที่กรองได้นั้น หลังจากที่กรองเป็นสารละลายใส นำไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (หัวข้อที่ 3.8.3.1)

3.5 การปรับค่าพีเอชหลังการปรับสภาพ

หลังจากการปรับสภาพด้วยสภาวะต่างๆแล้ว จะแบ่งตัวอย่างได้ออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนของเหลว และส่วนของแข็ง ซึ่งในส่วนของเหลวนั้นนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังที่กล่าวข้างต้น ส่วนของแข็งนั้นจะนำมาทำการปรับค่าพีเอชให้มีค่าเป็นกลาง ด้วยวิธีต่อไปนี้

3.5.1 การปรับค่าพีเอชแบบปกติ

ของแข็งที่ได้จากการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรด และสารละลายเบส นั้นจะนำมาทำการปรับค่าพีเอชให้มีค่าเป็นกลาง ด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น รอบละ 100 มิลลิลิตร ต่อของแข็งเริ่มต้น 5 กรัม โดยวัดค่าพีเอชทุกรอบ และบันทึกค่าพีเอชจนค่าพีเอชของน้ำล้างเท่ากับ 7 จากนั้นบันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้

3.5.1 การปรับค่าพีเอชแบบประหยัดน้ำ

ของแข็งที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด และสารละลายเบส นั้นจะนำมาทำการปรับค่าพีเอชด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น โดยเริ่มจากปริมาตรน้ำ 100 มิลลิลิตรต่อ 5 กรัมของของแข็งเริ่มต้น โดยล้างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยสารละลายเบส 2 รอบ และล้างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดใน 2 รอบ จากนั้นนำน้ำล้างที่ได้ของแข็งทั้งสองชนิดมาผสมกัน และวัดค่าพีเอช จากนั้นนำน้ำล้างไปล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสสลับกับของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด โดยวัดค่าพีเอชทุกรอบ บันทึกค่าพีเอช จนค่าพีเอชของน้ำล้างเท่ากับ 7 และถ้าปริมาตรน้ำล้างออกมาลดต่ำกว่าอัตราส่วนให้เติมน้ำจนเท่าอัตราส่วน และบันทึกปริมาตรน้ำที่ใช้

3.6 การย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

นำซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลา นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักแห้งไว้

ทำการย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ และอบแห้ง ด้วยการเติมอะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแห้ง 1 กรัม และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE1500 (บริษัทสยามวิคตอรี่เคมิคอล) ปริมาตร 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัมของน้ำหนักแห้ง และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยจะทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

เมื่อทราบเวลา และปริมาตรของเอนไซม์ที่เหมาะสม ในการทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด นำสภาวะที่เหมาะสมมาทำการย่อยโดยใช้น้ำประปาแทนอะซีเตตบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วนเดิม และทำการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดระหว่างการใช้น้ำประปา และอะซีเตตบัฟเฟอร์

นำสภาวะที่มีความเหมาะสมของการปรับสภาพด้วยกรด และเบส มาย่อยของแข็งที่ได้จากการปรับสภาพด้วยกรด และเบสที่ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 โมลาร์

โดยตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บได้ที่แต่ละชั่วโมง นั้นจะมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (หัวข้อ 3.8.3.1)

3.7 การผลิตบิวทานอล

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อทำโดยการนำหัวเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่เก็บในอาหารเหลว Reinforced clostridial (RCM) ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสมา 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร RCM ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ในแอนแอโรบิก จาร์ (Anaerobic jar) พร้อมกับใส่แผ่นดูดออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร GYCC ที่เตรียมไว้ โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร บ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร GYCC ที่เตรียมไว้ โดยใช้กลูโคสที่ปรับเปลี่ยนค่าความเข้มข้นแล้วเป็น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร บ่มในแอนแอโรบิกแชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792

การทดลองจะหมักในฟลาสก์ที่สภาวะนิ่ง โดยใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในอาหาร GYCC ซึ่งทำการลงเชื้อที่เป็นหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อการเตรียมหัวเชื้อ ดูดหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์อาหาร GYCC ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม และเพื่อศึกษาผลของสารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดต่อการเจริญของเชื้อ *C. acetobutylicum* DSM 792 เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส จากนั้นบ่มในแอนแอโรบิก แชมเบอร์ (Anaerobic Chamber) ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง โดยแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทั้ง 3 ฟลาสก์ ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง และหลอดน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณสารผลิตภัณฑ์จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้เครื่อง HPLC วิเคราะห์ความเป็นกรดด่างด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช (pH-indicator strips)

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เสร็จแล้วทำการเติมอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่ใช้ในงานวิจัยความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ที่เตรียมไว้ โดยทำการ

เติมอาหารปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในฟลาสก์ทั้ง 3 ฟลาสก์ เพื่อปรับปริมาตรอาหารให้เท่าเดิม และนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วย DNS และปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC

3.8 การวิเคราะห์

3.8.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร

3.8.1.1 ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC, 2000)

นำ กระป๋องอลูมิเนียมมีฝาปิด ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เปิดฝา) และเมื่อครบเวลา นำมาใส่ไว้โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น (ปิดฝา) และนำไปชั่งน้ำหนักจดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W) และทำการชั่งผงซังข้าวโพดที่ร่อนแล้ว 2กรัม ใส่ในถ้วย จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_1) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลานำมาใส่ไว้เดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็น (ปิดฝา) และนำไปชั่งน้ำหนักจดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) นำน้ำหนักก่อนอบและหลังอบมาทำการคำนวณหาร้อยละความชื้น จากสูตร

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{(W_1 - W) - (W_2 - W)}{(W_1 - W)} \times 100$$

3.8.1.2 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC, 2000)

<u>ก. ขั้นตอนการย่อย</u>

ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 2.0-3.0 กรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงในหลอดย่อย หลังจากนั้นใส่คะตะลิสต์ลงไปประมาณ 5 กรัม และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ลงไปประมาณ 20-25 มิลลิลิตร แล้วเขย่าเบาๆและใส่ boiling chip 2-3 เม็ด ทำการเปิดเครื่องย่อย แล้วตั้งหลอดย่อยในเครื่อง สวมเครื่องดักจับไอกรดลงบนส่วนบนของหลอดย่อย และเปิดเครื่องดักจับไอกรด โดยทำการย่อยในตู้ดูดควัน

กดปุ่มเริ่มทำงาน ที่เครื่องย่อย เมื่ออุณหภูมิได้ 420 องศาเซลเซียส แล้วทำการย่อยต่อไปอีก 2 ชั่วโมง จนตัวอย่างเป็นสารละลายสีเขียวใส จากนั้นยกหลอดย่อยออกมาตั้งพักไว้ให้เย็น และปิดเครื่องย่อย แต่ยังคงเปิดเครื่องดักจับไอกรดไว้เพื่อดักจับไอกรดที่ยังคงเหลืออยู่

<u>ข. ขั้นตอนการกลั่น</u>

เปิดเครื่องหล่อเย็น แล้วตั้งระบบการทำงานของเครื่องกลั่น จากนั้นเปิดเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยน้ำกลั่น และตวงสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ ซึ่งจะทำให้กลายเป็นสารละลายใส และจึงนำ

หลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น และวางขวดรูปชมพูที่บรรจุสารละลายกรดบอริกไว้บริเวณ Plateform ให้แท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก โดยปิด Safety door และทำการกลั่นเป็นเวลาประมาณ 4 นาที เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่ และหลอดย่อยออกจากเครื่อง

<u>ค. ขั้นตอนการไตเตรท</u>

นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์แมล จนได้สารละลายเป็นสีชมพูอ่อน โดยจะคำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้

$$\text{ร้อยละไนโตรเจน} = \frac{(\text{ปริมาตรของ } H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรท-ปริมาตรของ } H_2SO_4\text{ที่ใช้ไตเตรท Blank})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 0.1 \times 0.014 \times 100$$

ร้อยละโปรตีน = ร้อยละไนโตรเจน × conversion factor (6.25)

3.8.1.3 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC, 2000)

อบฟลาสก์สกัดไขมันที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลานำมาใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นชั่งน้ำหนักของฟลาสก์ จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน และทำการชั่งผงซังข้าวโพด (ที่ผ่านการอบ 24 ชั่วโมง) 2กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน แล้วใส่ในทิมเบิล หลังจากนั้นนำทิมเบิลที่มีตัวอย่างใส่ลงไปในส่วนของ extraction tube จากนั้นต่อฟลาสก์เข้ากับส่วนของ extraction tube และ condenser และทำการเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงไปในส่วนของ extraction tube เพื่อให้ไหลลงไปในส่วนฟลาสก์ และทำการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแยกเอาฟลาสก์ออกจากเครื่องสกัด แล้วใช้คีมคีบทิมเบิลออกจากหลอด นำฟลาสก์ไประเหยเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออก แล้วอบที่อุณหูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายจะระเหยหมด จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และทำการชั่งน้ำหนัก โดยจะสามารถคำนวณหาค่าปริมาณไขมันได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.1.4 ปริมาณเยื่อใยหยาบ (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC, 2000 และ Ceirwyn, 1995)

นำซังข้าวโพดที่ผ่านการวิเคราะห์ความชื้นและสกัดไขมันแล้ว (หากในซังข้าวโพดมีไขมันน้อยไม่จำเป็นต้องสกัดไขมัน) และอบถ้วยแก้วสำหรับการวิเคราะห์เยื่อใย ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา1 ชั่วโมง และทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักและบันทึกไว้ บดซังข้าวโพดให้ละเอียด ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ1กรัม สูง 1 มิลลิเมตร (F_0) แล้วใส่ในถ้วยแก้ว จากนั้นวางถ้วยแก้วลงในหลุมที่อยู่บนเครื่องสกัดเส้นใย จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น0.01N ที่ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้ว ลงในท่อแก้วคอนเดนเซอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตร และกรองสารละลายออก (เปิดลิ้นที่

vacuum) และล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร (ในการล้างแต่ละครั้งให้เปิดลิ้นไปที่ Pressure เพื่อดันให้อากาศผ่านฐานของถ้วยแก้ว ทำให้ส่วนผสมในถ้วยแก้วคลุกเคล้ากันตลอด) ทำการเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.23 นอร์แมล ที่ทำให้ร้อนลงไปประมาณ 150 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที จากนั้นกรองเอาสารละลายเบสออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นอีกครั้งหนึ่ง และล้างด้วยอะซิโตน อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร แล้วทำให้แห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้น้ำหนักที่คงที่ ซึ่งน้ำหนักที่ได้จะเป็นน้ำหนักของเยื่อไยหยาบรวมกับน้ำหนักเถ้า (Ash) (F_1) จากนั้นนำกากที่ได้ใส่ครูสิเบิล (ชั่งน้ำหนัก) แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักจะได้น้ำหนักเถ้า (F_2) โดยจะสามารถคำนวณหาค่าปริมาณเยื่อใยหยาบได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละเยื่อใยหยาบ (Crude fiber)} = \frac{(F_1 - F_2)}{F_0} \times 100$$

3.8.1.5 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC, 2000 และ Ceirwyn, 1995)

นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลานำมาใส่ไว้โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นชั่งน้ำหนัก จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน และทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม นำไปทำการเผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เผาไล่ควันไปเผาต่อในเตาเผา (muffer furnace) อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วปิดสวิทช์เตาเผา และรอจนอุณหภูมิภายในเตาลด และนำถ้วยออกมาใส่ไว้โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นชั่งน้ำหนัก โดยจะสามารถคำนวณหาค่าปริมาณเถ้าได้จากสูตร

$$\text{ร้อยละเถ้า} = \frac{(\text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างหลังเผา} - \text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างก่อนเผา})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ดัดแปลงจากวิธีของ Van Soest และคณะ, 1991)

3.8.2.1 ปริมาณเฮมิเซลลูโลส

การวิเคราะห์หาปริมาณเฮมิเซลลูโลส สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย Neutral detergent กับตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย Acid detergent

โดยทำการทดลองโดยทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย Neutral detergent เพื่อหาร้อยละ NDF (Neutral Detergent Fibers) เริ่มทำการทดลองโดยชั่งตัวอย่างซังข้าวโพดที่แห้งประมาณ 1 กรัม ทำการเติมสารละลาย Neutral detergent 100 มิลลิลิตร โซเดียมซัลเฟต 0.5 กรัม และ ดีคาไฮโดรแนฟทาลีน 2 มิลลิลิตร นำไปต้ม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วไปกรอง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อน 3 – 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยอะซิโตน 2 ครั้ง ดูดสารละลายออกด้วยเครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) จนแห้งจากนั้นนำตัวอย่างใส่ถ้วยเผาไปอบที่ 100 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำถ้วยเผาออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นคือ ปริมาณ Neutral detergent (NDF)

จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างด้วยสารละลาย Acid Detergent เพื่อวิเคราะห์หาร้อยละเฮมิเซลลูโลส นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วย Neutral detergent มาทำการต้มด้วย Acid Detergent โดยเติม Acid Detergent 20 มิลลิลิตร และ ดีคาไฮโดรแนฟทาลีน 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเดือด ทำการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำร้อน 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย เอทานอล ร้อยละ 80 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำตัวอย่างใส่ถ้วยเผา ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปวางในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ Acid Detergent fiber (ADF) โดยน้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF กับ ADF คือ น้ำหนักเฮมิเซลลูโลส

3.8.2.2 ปริมาณเซลลูโลส

สามารถคำนวณหาปริมาณเซลลูโลส โดยวิธีวิเคราะห์หา Acid Detergent Lignin (ADL) ทำได้โดยนำครูซิเบิล ที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หา ADF แล้วมาเติมสารละลาย กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 72 ที่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส) ลงไป ประมาณครึ่งครูซิเบิล จากนั้นนำไปวางลงในถาดสเตนเลส ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่วเพื่อให้ตัวอย่างแยกจากกันไม่จับกันเป็นก้อน โดยมีน้ำกลั่นที่อยู่ในถาดสเตนเลสระดับที่ต่ำกว่าระดับของแผ่นแก้วบอกปริมาตร รักษาอุณหภูมิของครูซิเบิลในถาดสเตนเลสที่ 20 - 23 องศาเซลเซียส คอยเติมสารละลาย กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น72เปอร์เซ็นต์เมื่อสารละลายในครูซิเบิลแห้ง คนเป็นระยะๆ ใช้เวลาย่อยนาน 3 ชั่วโมงจากนั้นล้างสารละลายกรดออกแล้วล้างด้วยน้ำร้อน โดยใช้น้ำร้อนปริมาณ 1,400 มิลลิลิตร หรือจนหมดกรด จากนั้นใช้ขวดฉีดน้ำร้อน ไล่ตัวอย่างที่ติดอยู่ข้างครูซิเบิลให้ลงไปใน ครูซิเบิลให้หมด แล้วฉีดล้างครูซิเบิลอีกหนึ่งครั้ง นำครูซิเบิล พร้อมตัวอย่างที่ย่อยแล้ว ไปอบในตู้อบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง และนำออกใส่โถดูดความชื้น (dessicator) ปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักและบันทึกไว้ และสามารถคำนวณหาร้อยละเซลลูโลสได้จากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละเซลลูโลส} = \frac{(\text{น้ำหนักขั้นตอน ADF และครูซิเบิล} - \text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.2.3 ปริมาณลิกนิน

สามาถรถคำนวณหาปริมาณลิกนินได้โดยการนำครูซิเบิล ที่มีตัวอย่างซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสแล้ว นำไปเผา (ignite) ในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงจากนั้นเอาออกใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนักหาลิกนิน

$$\text{ร้อยละลิกนิน} = \frac{(\text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างหลังอบ} - \text{น้ำหนักครูซิเบิลพร้อมตัวอย่างก่อนอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

3.8.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.8.3.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (ดัดแปลงจากวิธีของ Miller และคณะ, 1959)

นำสารละลายน้ำหมักที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น (0 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่จะวิเคราะห์มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา และใส่น้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.2-0.8 โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งกราฟมาตรฐานได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และค่าความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐานมาพล็อตกราฟ จะได้เป็นกราฟมาตรฐาน แล้วหาความชันของกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในหน่วยกรัมต่อลิตร ตามสมการด้านล่าง

$$\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

3.8.3.2 ค่าพีเอช

ทำการวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษวัดค่าพีเอช (pH-indicator strips) ยี่ห้อ McolorpHast™ โดยทำการวัดหลังจากการเก็บตัวอย่างทันที

3.8.3.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง

ทำการชั่งหลอดเซนติฟิวส์ก่อนอบ นำเซลล์ที่เลี้ยงลงหลอดเซนติฟิวส์และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และทำการล้างตะกอน 1-2 รอบ จากนั้นนำหลอดเซนติฟิวส์ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในโถดูดความชื้น เพื่อรอให้เย็น และทำการชั่งน้ำหนักหลอดหลังอบ เพื่อคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์หลังอบ} - \text{น้ำหนักหลอดก่อนอบ}) \times 1000}{3}$$

3.8.3.4 ปริมาณบิวทานอล และสารอินทรีย์อื่นๆ

การวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ทั้งหมดโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography ; HPLC) โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางด้วยสารละลายกรดซิตริก เข้มข้นร้อยละ 2 ในอัตราส่วน สารตัวอย่างต่อกรดซิตริก เท่ากับ 1 ต่อ 9 จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของบิวทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซีติก และกรดบิวทีริก โดยใช้เครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิลิเมตร ความยาว 150 มิลลิลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยวัดค่า Refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสงใช้ run time 12 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี Retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของสารต่างๆเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.8.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ได้จากวิธี DNS ค่าพีเอช ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ตรวจได้จากเครื่อง HPLC มาวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ผลทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

เพื่อการศึกษาแหล่งน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางเกษตร คือ ซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มาเป็นแหล่งน้ำตาล โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นชุดควบคุม ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสเทอีน (Glucose Yeast extract Casein Cysteine, GYCC) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลดังกล่าวเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร

โดยทำการทดลองโดยเริ่มจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใยหยาบ เถ้า และคาร์โบไฮเดรต จากนั้นนำไปทำการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนทำการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 0.2 - 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 - 1 โมลาร์ และน้ำกลั่น เพื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพมาย่อยด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 ปริมาณ 0 – 1.0 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ และนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำการเก็บทุกช่วงเวลาไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาค่าพีเอชของน้ำหมัก วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

4.1 ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด

จากการทดลองในการวิเคราะห์องค์ประกอบซังข้าวโพด โดยนำซังข้าวโพดที่ผ่านการตากแห้งมาแล้ว บดด้วยเครื่องบดอุตสาหกรรมเพื่อให้เป็นผง แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 300 ไมโครเมตร

4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพดจากจังหวัดสระแก้ว ซึ่งเป็นซังข้าวโพดที่ผ่านการตากแห้งแล้ว พบว่าในซังข้าวโพดนั้นมีปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 39.19 เป็นแงค์ประกอบที่พบมากที่สุดในซังข้าวโพด ดังตารางที่ 4.1

และจากการศึกษาของเสาวลักษณ์ (2554) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเศษเหลือจากการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เช่น ต้นข้าวโพด ซังข้าวโพด เปลือกฝักข้าวโพด และไหม ซึ่งมีมากใน เกือบทุกภาคของประเทศและเกือบตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในเขตชลประทาน พบว่าคุณค่าทางอาหารของซังข้าวโพด มีปริมาณเยื่อใยหยาบอยู่ถึงร้อยละ 23 – 36 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้พบว่ามีปริมาณเยื่อใยหยาบเป็นองค์ประกอบที่ใกล้เคียงกัน โดยทั้งนี้องค์ประกอบของซังข้าวโพดทั้งปริมาณโปรตีน ไขมัน รวมถึงองค์ประกอบอื่นๆ จะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวโพด

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของซังข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบซังข้าวโพด	ร้อยละ (วัตถุแห้ง)
ความชื้น	4.58
โปรตีน	0.04
ไขมัน	5.28
เยื่อใยหยาบ	39.19
เถ้า	1.89
เซลลูโลส	31.04
เฮมิเซลลูโลส	27.12
ลิกนิน	4.24

ส่วนการวิเคราะห์องค์ประกอบของซังข้าวโพด ในส่วนขององค์ประกอบเยื่อใย ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งทำการส่งตัวอย่างผงซังข้าวโพดไปที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ (Animal Nutrition Laboratory) ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบดังกล่าว โดยทำการวิเคราะห์หาร้อยละ NDF ร้อยละ ADF และร้อยละ ADL ดัดแปลงจาก Van Soest, P.J. และคณะ (1991) เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน พบว่าซังข้าวโพดที่ได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดถึงร้อยละ 31.04 รองลงมาเป็นเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 27.12 และลิกนินร้อยละ 4.24 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1

และจากรายงานการวิเคราะห์องค์ประกอบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่จัดทำโดยกรมพัฒนาพลังงานทดแทน และอนุรักษ์พลังงาน พบว่าซังข้าวโพดมีปริมาณเซลลูโลสประมาณร้อยละ 45 ปริมาณเฮมิเซลลูโลสประมาณร้อยละ 35 และปริมาณลิกนินประมาณร้อยละ 15 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ในโครงงานนี้ ว่าในซังข้าวโพดนั้นจะพบปริมาณเซลลูโลสมากที่สุด รองลงมาคือปริมาณเฮมิเซลลูโลส และน้อยที่สุดคือปริมาณลิกนิน แต่อย่างไรก็ตามซังข้าวโพดที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณน้อยกว่า โดยกล่าวถึงปริมาณไว้ในข้างต้น ซึ่งโดยปกติปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จะมีความแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และภาวะที่เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ (พรรณวิไล, 2545)

4.2 การปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อย

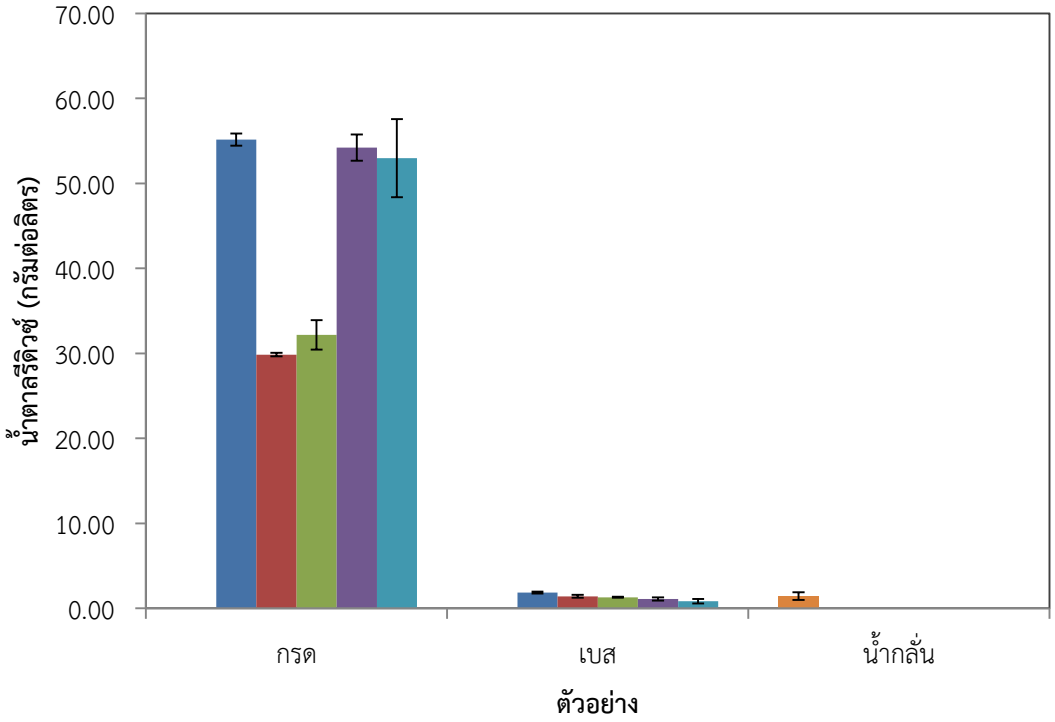
จากการนำผงซังข้าวโพดที่ผ่านการร่อนที่มีขนาด 300 ไมโครเมตร มาทำการปรับสภาพการการย่อย โดยปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.2 – 1.0 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 – 1.0 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยปรับสภาพตัวอย่างปริมาณ 5 กรัม และปริมาตรสารละลาย 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งใช้วิธีการบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4.2.1 ผลของสารละลายกรดและเบสต่อการปรับสภาพซังข้าวโพด

หลังทำการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนทำการย่อย จะพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากของเหลวจากการปรับสภาพก่อนทำการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น (รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.2) ของเหลวจากการปรับสภาพที่แสดงจะเห็นได้ว่ากรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 55.14 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ 0.4 และ 0.6 โมลาร์ และน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นเกือบเท่ากับความเข้มข้นของกรดที่ 0.2 โมลาร์เมื่อใช้กรดที่ 0.8 และ 1.0 โมลาร์ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่ 0.2 0.8 และ 1.0 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ส่วนของเหลวจากการปรับสภาพก่อนทำการย่อยผงซังข้าวโพดด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดคือ 1.88 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงเรื่อยๆเมื่อใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์มากขึ้น เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่ 0.2 โมลาร์ ไม่มีความแตกต่างจากความเข้มข้นอื่นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และของเหลวจากการปรับสภาพก่อนทำการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยน้ำกลั่น มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์คือ 1.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าหลังปรับสภาพซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริกจะได้น้ำตาลมากที่สุดในทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบที่มีอยู่ในซังข้าวโพดนั้น อาจจะถูกสารละลายกรดซัลฟิวริกย่อยให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า ซึ่งปริมาณองค์ประกอบที่หลงเหลือ

อยู่ในส่วนตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดนั้นจึงอาจจะเหลือน้อยกว่าองค์ประกอบที่เหลืออยู่ในส่วนตะกอนที่ปรับสภาพด้วยเบส



รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันดังระบุในวงเล็บที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (■ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ■ ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ■ ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ■ ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ■ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ■ น้ำกลั่น)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นสารละลาย (โมลาร์)	**ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)**		
	กรด	**เบส**	**น้ำกลั่น**
0	-	-	1.88 ± 0.44
0.2	55.14^{b} ± 0.71	1.88^{d} ± 0.11	-

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่พบในส่วนใสซึ่งแยกจากตะกอนซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยน้ำกลั่น สารละลายกรดซัลฟิวริก และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆกันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นสารละลาย (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	กรด	เบส	น้ำกลั่น
0.4	$29.86^{a} \pm 0.20$	$1.41^{c} \pm 0.17$	-
0.6	$32.18^{a} \pm 1.74$	$1.31^{bc} \pm 0.06$	-
0.8	$54.21^{b} \pm 1.54$	$1.11^{ab} \pm 0.20$	-
1.0	$52.96^{b} \pm 4.59$	$0.86^{a} \pm 0.26$	-

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

4.2.2 การศึกษาการปรับค่าพีเอชให้ประหยัดน้ำก่อนการย่อย

ส่วนของแข็งที่เหลือจากการปรับสภาพจะทำการปรับค่าพีเอชให้เป็นกลาง โดยทำการล้างด้วยน้ำกลั่นแบบปกติรอบละ 100 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่นแบบสลับระหว่างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และของแข็งที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์

จากการทดลองในการล้างด้วยน้ำกลั่นปกติใช้ปริมาณน้ำรอบละ 100 มิลลิลิตร โดยการล้างของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสใช้ปริมาตรน้ำเพียง 500 มิลลิลิตร ก็สามารถทำให้ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสสามารถกลายเป็นกลางได้ ในขณะที่ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดต้องใช้ปริมาตรน้ำล้างถึง 1000 มิลลิลิตร เพื่อทำให้ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดกลายมีค่าพีเอชเป็นกลาง โดยปริมาตรน้ำที่ใช้ทั้งหมด เท่ากับ 1500 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.3

ส่วนการล้างสลับของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสและกรดใช้ปริมาตรน้ำเพียง 922 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) ก็สามารถทำให้ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสและกรดกลายเป็นกลางได้ ดังนั้น จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าการล้างแบบสลับจะได้ผลที่ดีกว่าการล้างแบบปกติ เนื่องจากประหยัดน้ำที่ใช้ล้างได้มากกว่า

ตารางที่ 4.3 ค่าพีเอช และปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างของแข็งในแต่ละรอบ และปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ใช้ในการล้างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยทำการล้างรอบละ 100 มิลลิลิตร

ล้างรอบที่	ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส		ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด	
	ค่าพีเอช	ปริมาตรน้ำที่ใช้รวม (มิลลิลิตร)	ค่าพีเอช	ปริมาตรน้ำที่ใช้รวม (มิลลิลิตร)
1	11.5	100	2	100
2	10.5	200	3	200
3	9	300	4.5	300
4	7.5	400	5	400
5	7	500	5.5	500
6			5.5	600
7			5.5	700
8			6	800
9			6	900
10			7	1000

ตารางที่ 4.4 ค่าพีเอช และปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ในการล้างของแข็งในแต่ละรอบโดยล้างแบบสลับระหว่างของแข็งที่ปรับสภาพด้วยกรดและของแข็งที่ปรับสภาพด้วยเบส และปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ใช้ในการล้างของแข็ง โดยทำการล้างรอบละ 100 มิลลิลิตร

ล้างรอบที่	ค่าพีเอช			ปรับปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำที่ใช้รวม (มิลลิลิตร)
	เบส	กรด	ผสม		
1	12.28	1.91	3.45	-	200
2	10.97	2.89	6.80	13	400
3	7			9	413
		5.5		-	422
4		5.5		-	522
5		5.5		-	622
6		6		-	722
7		6.5		-	822
8		7		-	922

4.3 การย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพ โดยทำการย่อยตัวอย่างในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรเอนไซม์ 0 – 1.0 มิลลิลิตร ต่อปริมาณตัวอย่าง 1 กรัม ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

4.3.1 การเปรียบเทียบอัตราส่วนเอนไซม์ต่อซังข้าวโพด

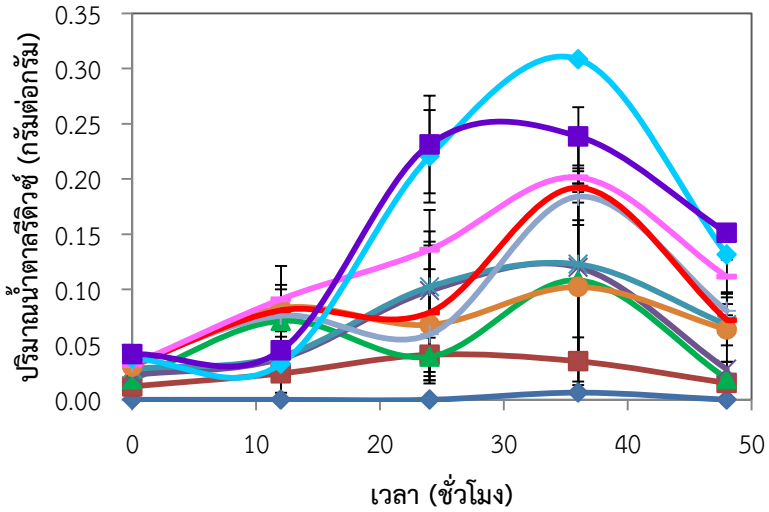
จากการทดลองการย่อยซังข้าวโพดโดยใช้สภาวะปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยทำการย่อยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

จากรูปที่ 4.2ก แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ซึ่งแสดงให้ว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง นั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันพบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม นั้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.3085 กรัมต่อกรัม เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันที่เวลา 36 ชั่วโมง

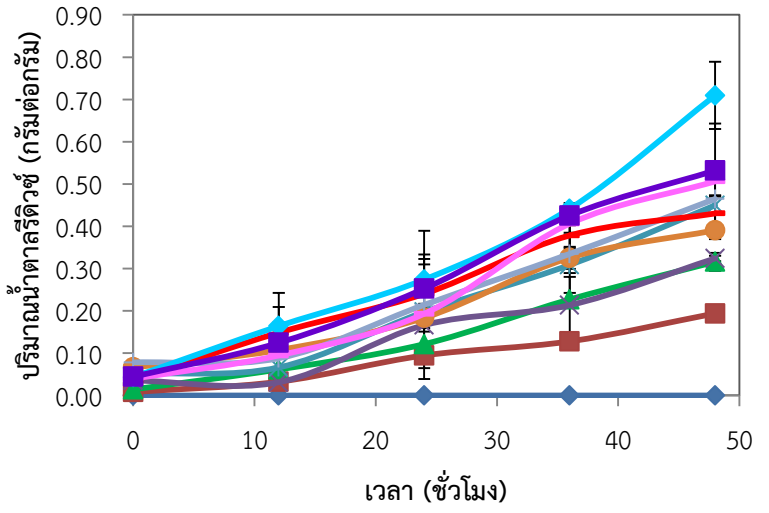
เมื่อทำการทดลองการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 4.2ข) พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ที่เวลา 0 ชั่วโมง และที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีปริมาณน้ำรีดิวซ์สูงที่สุดของทุกอัตราส่วนเอนไซม์ เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปริมาณเอนไซม์ที่ใส่แตกต่างกัน พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง การใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม นั้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.7096 กรัมต่อกรัม

และจากรูปที่ 4.2ค แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น โดยทำการย่อยเป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง พบว่าตั้งแต่ช่วงเวลาชั่วโมงที่ 24 – 48 นั้นมีปริมาณน้ำรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน และเมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 12 นอกจากนั้นหากเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่าง 1 กรัม นั้นจะทำให้ได้ปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงที่สุด เท่ากับ 0.0794 กรัมต่อกรัม เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการใช้อัตราส่วนเอนไซม์ที่แตกต่างกันที่เวลา 24 ชั่วโมง

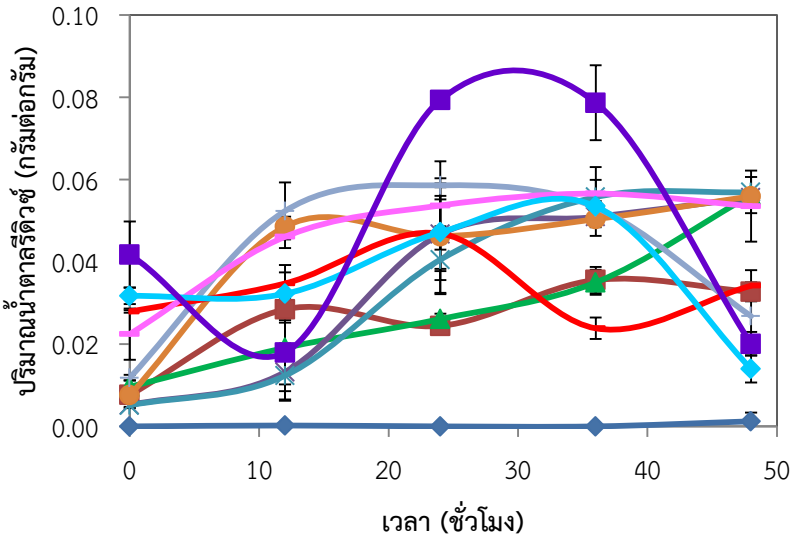


(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELLERASE1500 ที่อัตราส่วนต่างๆกันดังระบุในวงเล็บ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งซังข้าวโพดผ่านการปรับสภาพด้วย (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค) น้ำกลั่น (◆ ปริมาณเอนไซม์ 0 มิลลิลิตร ■ ปริมาณเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ▲ ปริมาณเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร × ปริมาณเอนไซม์ 0.3 มิลลิลิตร ✱ ปริมาณเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร ● ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร + ปริมาณเอนไซม์ 0.6 มิลลิลิตร ▬ ปริมาณเอนไซม์ 0.7 มิลลิลิตร ▬ ปริมาณเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตร ◆ ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร ■ ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร)



(ค)

รูปที่ 4.2 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELLERASE1500 ที่อัตราส่วนต่างๆกันดังระบุในวงเล็บ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งซังข้าวโพดผ่านการปรับสภาพด้วย (ก) สารละลายกรดซัลฟิวริก (ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ค) น้ำกลั่น (◆ ปริมาณเอนไซม์ 0 มิลลิลิตร ■ ปริมาณเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ▲ ปริมาณเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร × ปริมาณเอนไซม์ 0.3 มิลลิลิตร ✱ ปริมาณเอนไซม์ 0.4 มิลลิลิตร ● ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร + ปริมาณเอนไซม์ 0.6 มิลลิลิตร ▬ ปริมาณเอนไซม์ 0.7 มิลลิลิตร ▬ ปริมาณเอนไซม์ 0.8 มิลลิลิตร ◆ ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร ■ ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร)

นอกจากนั้นจากการทดลองพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนทำการย่อย จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกในการปรับสภาพ ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากส่วนของเหลว โดยของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดนั้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าของเหลวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายเบส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายกรดนั้นย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดได้มากกว่าสารละลายเบส จึงทำให้เหลือองค์ประกอบในส่วนตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดน้อยกว่าตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส เมื่อนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจึงได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดน้อยกว่าตะกอนที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 1.0 โมลาร์

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0065^{a} ± 0.0100	0.0000^{a} ± 0.0000
0.1	0.0122^{b} ± 0.0003	0.0239^{ab} ± 0.0174	0.0408^{ab} ± 0.0154	0.0349^{ab} ± 0.0216	0.0152^{ab} ± 0.0006
0.2	0.0185^{c} ± 0.0019	0.0715^{cd} ± 0.0075	0.0390^{ab} ± 0.0212	0.1082^{abc} ± 0.0704	0.0191^{ab} ± 0.0024
0.3	0.0225^{c} ± 0.0005	0.0372^{b} ± 0.0039	0.0987^{bc} ± 0.0537	0.1198^{bc} ± 0.1128	0.0275^{b} ± 0.0067
0.4	0.0280^{d} ± 0.0010	0.0394^{b} ± 0.0176	0.1023^{bc} ± 0.0374	0.1227^{bc} ± 0.1145	0.0680^{c} ± 0.0187
0.5	0.0301^{de} ± 0.0006	0.0831^{d} ± 0.0381	0.0680^{abc} ± 0.0502	0.1022^{abc} ± 0.0605	0.0637^{c} ± 0.0290
0.6	0.0335^{ef} ± 0.0032	0.0761^{d} ± 0.0066	0.0592^{abc} ± 0.0376	0.1840^{cd} ± 0.0256	0.0806^{c} ± 0.0168
0.7	0.0314^{de} ± 0.0067	0.0810^{d} ± 0.0189	0.0791^{bc} ± 0.0642	0.1921^{cd} ± 0.0039	0.0722^{c} ± 0.0045
0.8	0.0316^{de} ± 0.0016	0.0910^{d} ± 0.0132	0.1360^{bc} ± 0.0361	0.2014^{cd} ± 0.0056	0.1115^{d} ± 0.0156
0.9	0.0375^{fg} ± 0.0025	0.0325^{b} ± 0.0097	0.2205^{d} ± 0.0419	$0.3085e^{e}$ ± 0.0017	0.1315^{de} ± 0.0008
1.0	0.0414^{g} ± 0.0009	0.0448^{bc} ± 0.0034	0.2312^{d} ± 0.0442	0.2386^{de} ± 0.0263	0.1512^{e} ± 0.0062

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f, g ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000
0.1	0.0083^{b} ± 0.0018	0.0325^{ab} ± 0.0048	0.0947^{ab} ± 0.0135	0.1279^{b} ± 0.0094	0.1941^{b} ± 0.0159
0.2	0.0144^{c} ± 0.0015	0.0616^{abc} ± 0.0017	0.1214^{bc} ± 0.0565	0.2270^{c} ± 0.0153	0.3160^{c} ± 0.0212
0.3	0.0355^{d} ± 0.0002	0.0314^{ab} ± 0.0048	0.1664^{bcd} ± 0.0072	0.2136^{d} ± 0.0666	0.3241^{c} ± 0.0062
0.4	0.0513^{f} ± 0.0074	0.0664^{abc} ± 0.0010	0.1976^{bcd} ± 0.0164	0.3088^{d} ± 0.0979	0.4498^{de} ± 0.0210
0.5	0.0664^{f} ± 0.0067	0.1075^{bcd} ± 0.0616	0.1837^{bcd} ± 0.0329	0.3257^{d} ± 0.0262	0.3907^{c} ± 0.0160
0.6	0.0783^{f} ± 0.0036	0.0882^{bcd} ± 0.0384	0.2143^{bcd} ± 0.1749	0.3348^{de} ± 0.0453	0.4648^{de} ± 0.0649
0.7	0.0357^{d} ± 0.0007	0.1486^{cd} ± 0.0943	0.2404^{cd} ± 0.0695	0.3784^{def} ± 0.0301	0.4304^{de} ± 0.0433
0.8	0.0398^{de} ± 0.0005	0.0948^{bcd} ± 0.0780	0.1933^{bcd} ± 0.0153	0.4063^{ef} ± 0.0210	0.5063^{e} ± 0.1364
0.9	0.0435^{e} ± 0.0029	0.1641^{d} ± 0.0450	0.2741^{d} ± 0.0593	0.4416^{f} ± 0.0136	0.7096^{f} ± 0.0795
1.0	0.0445^{e} ± 0.0003	0.1246^{cd} ± 0.0303	0.2526^{d} ± 0.0706	0.4256^{f} ± 0.0234	0.5321^{e} ± 0.0195

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
0	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0002^{bc} ± 0.0003	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0000^{a} ± 0.0000	0.0012^{a} ± 0.0021
0.1	0.0076^{bc} ± 0.0008	0.0285^{bc} ± 0.002	0.0244^{b} ± 0.0004	0.0356^{c} ± 0.0032	0.0327^{e} ± 0.0023
0.2	0.0096^{bc} ± 0.0016	0.0191^{b} ± 0.0089	0.0261^{b} ± 0.0013	0.0350^{c} ± 0.0030	0.0562^{e} ± 0.0044
0.3	0.0052^{ab} ± 0.0008	0.0132^{b} ± 0.0069	0.0467^{cd} ± 0.0084	0.0509^{d} ± 0.0021	0.0556^{e} ± 0.0003
0.4	0.0051^{ab} ± 0.0004	0.0123^{b} ± 0.0058	0.0405^{c} ± 0.0081	0.0557^{d} ± 0.0073	0.0569^{e} ± 0.0004
0.5	0.0076^{bc} ± 0.0004	0.0486^{e} ± 0.0024	0.0462^{cd} ± 0.0141	0.0504^{d} ± 0.0040	0.0559^{e} ± 0.0004
0.6	0.0118^{c} ± 0.0007	0.0523^{e} ± 0.0070	0.0586^{d} ± 0.0005	0.0532^{d} ± 0.0016	0.0268^{cd} ± 0.0073
0.7	0.0279^{e} ± 0.0003	0.0347^{d} ± 0.0027	0.0469^{cd} ± 0.0091	0.0238^{b} ± 0.0026	0.0342^{d} ± 0.0038
0.8	0.0224^{d} ± 0.0063	0.0461^{e} ± 0.0027	0.0537^{cd} ± 0.0107	0.0566^{d} ± 0.0034	0.0535^{e} ± 0.0086
0.9	0.0317^{e} ± 0.0020	0.0322^{cd} ± 0.0070	0.0472^{cd} ± 0.0116	0.0535^{d} ± 0.0006	0.0140^{b} ± 0.0033
1.0	0.0417^{f} ± 0.0081	0.0180^{b} ± 0.0094	0.0794^{e} ± 0.0020	0.0787^{e} ± 0.0091	0.0201^{bc} ± 0.0029

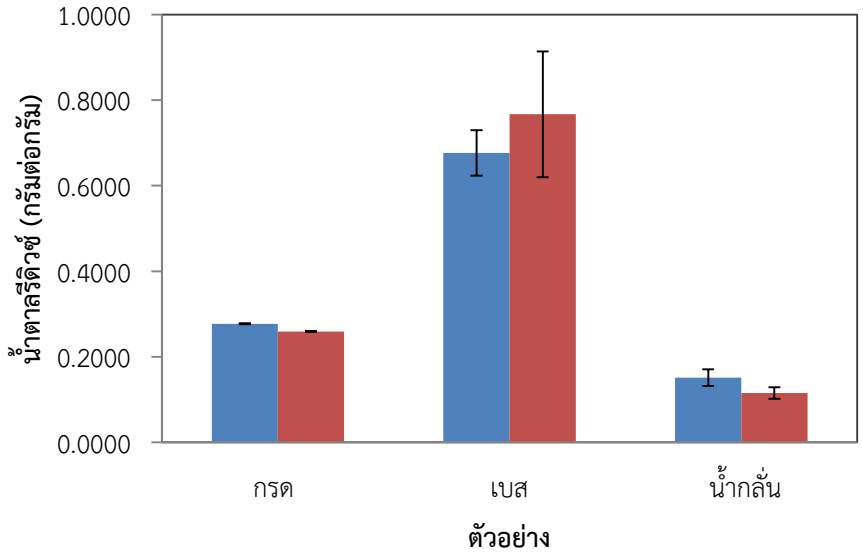
หมายเหตุ a, b, c, d, e, f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3.2 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองการหลังจากที่ได้สภาวะในการย่อยซังข้าวโพดทั้งปริมาณเอนไซม์ และเวลา จึงนำสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดมาทำการย่อยตัวอย่าง โดยใช้น้ำประปาแทนอะซีเตตบัฟเฟอร์ เพื่อ

โดยจากการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์นั้น มีสภาวะที่เหมาะสมคือที่เวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการใช้บัฟเฟอร์เท่ากับ 0.2774 กรัมต่อกรัม ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้น้ำประปาเท่ากับ 0.2594 กรัมต่อกรัม (รูปที่ 4.5) ซึ่งสภาวะที่ใช้น้ำบัฟเฟอร์นั้นทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าสภาวะที่ใช้น้ำประปา และเมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.3 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE1500 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ย่อยซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำกลั่น โดยมีการใช้บัฟเฟอร์ (■) และไม่ใช้บัฟเฟอร์ (■)

ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยคือใช้เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาตรเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร โดยจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการใช้บัฟเฟอร์เท่ากับ 0.6767 กรัมต่อกรัม ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้น้ำประปาเท่ากับ 0.7670 กรัมต่อกรัม ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งสภาวะที่ใช้น้ำประปานั้นทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าสภาวะที่ใช้บัฟเฟอร์ แต่เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และเนื่องจากค่าพีเอชของน้ำประปาในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองมีค่าไม่เท่ากันจึงไม่สามารถนำมาใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมได้ เพราะในการใช้เอนไซม์ในการย่อยต้องมีการควบคุมค่าพีเอช เนื่องจากค่าพีเอชคือหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะต้องมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น เพื่อให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ (อารี, 2555)

ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น คือใช้เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตรเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม จากรูปที่ 4.5 ซึ่งจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการใช้บัฟเฟอร์เท่ากับ 0.1514 กรัมต่อกรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้น้ำประปาเท่ากับ 0.1154 กรัมต่อกรัม เมื่อคำนวณเปรียบเทียบสภาวะหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.8 ผลของการใช้บัฟเฟอร์ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ACCELERASE1500 และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ย่อยซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก ที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร 36 ชั่วโมง ส่วนซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตร 48 ชั่วโมง และซังข้าวโพดที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร 24 ชั่วโมง

ชนิดสาร	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)		
	กรด	เบส	น้ำกลั่น
บัฟเฟอร์	$0.2774^{b} \pm 0.0009$	$0.6767^{a} \pm 0.0533$	$0.1514^{b} \pm 0.0194$
น้ำประปา	$0.2594^{a} \pm 0.0009$	$0.7670^{a} \pm 0.1469$	$0.1154^{a} \pm 0.0137$

หมายเหตุ a, b ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

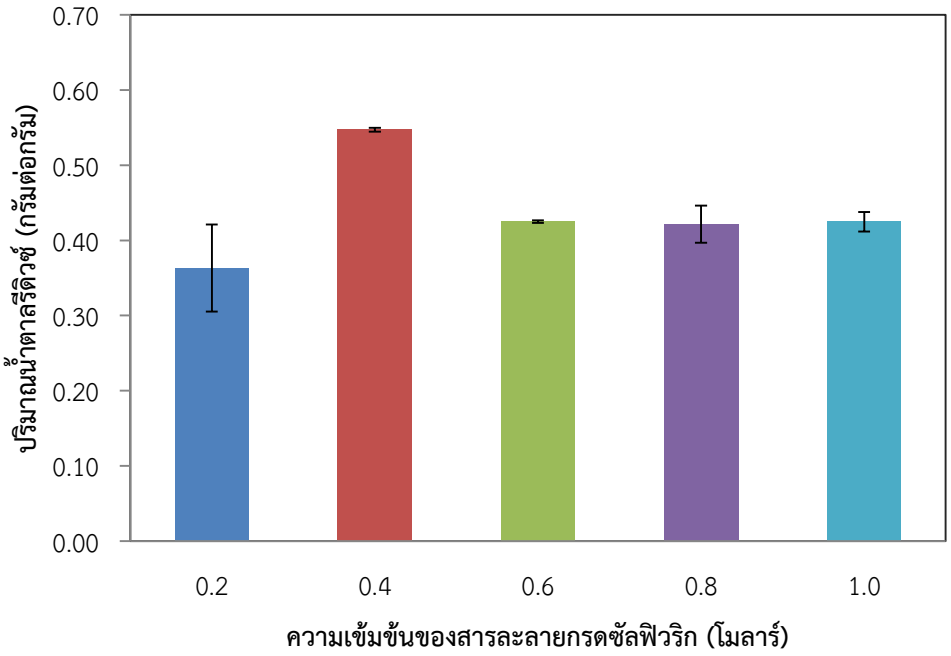
จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการย่อยตัวอย่างกรด คือ ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยตัวอย่างเบส คือ ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยตัวอย่างน้ำกลั่น คือ ปริมาณเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตรต่อกรัม ทำการย่อยโดยบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 ผลของความเข้มข้นสารละลายกรด และเบส ที่ใช้ในการปรับสภาพต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองการหลังจากที่ได้สภาวะในการย่อยซังข้าวโพดทั้งปริมาณเอนไซม์ เวลา และการใช้บัฟเฟอร์ในการควบคุมค่าพีเอชแล้ว จึงนำสภาวะที่เหมาะสมทั้งหมดนี้ที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาล

รีดิวซ์สูงสุดมาทำการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพกรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ และตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์

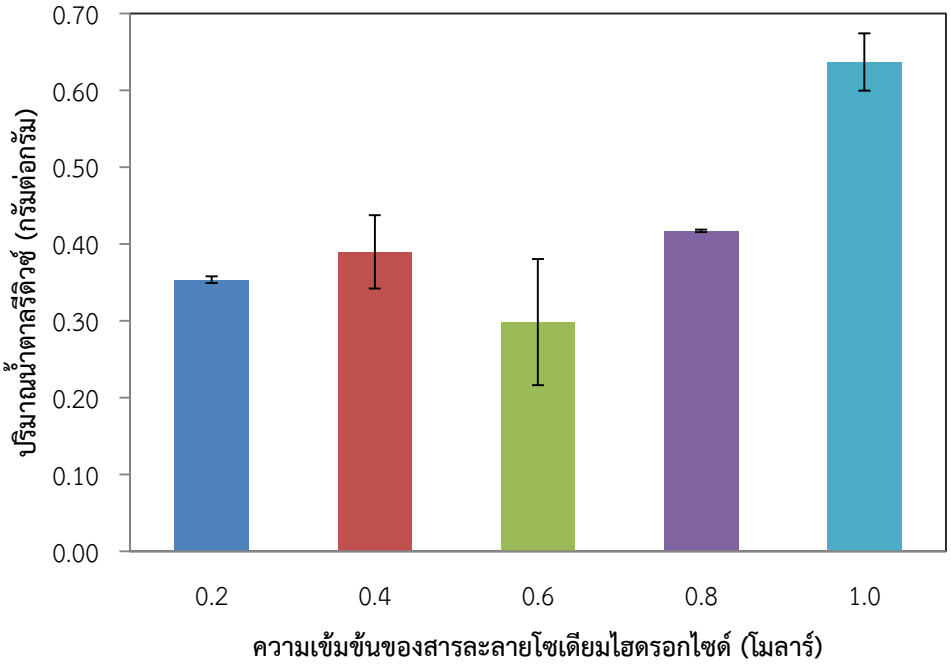
โดยจากการทดลองการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดนั้น มีสภาวะที่เหมาะสมคือที่เวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 1 กรัม และใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 และเมื่อทำการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.4 โมลาร์ นั้นได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 0.5471 กรัมต่อกรัม ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ต่ำที่สุดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.2 โมลาร์ ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.3633 กรัมต่อกรัม และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.6 โมลาร์ เท่ากับ 0.4249 กรัมต่อกรัม ที่สารละลายเบสเข้มข้น 0.8 โมลาร์เท่ากับ 0.4216 กรัมต่อกรัม และที่สารละลายเบสเข้มข้น 1.0 โมลาร์เท่ากับ 0.4248 กรัมต่อกรัม แสดงดังรูปที่ 4.4 เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 – 1 โมลาร์

ส่วนการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบส (รูปที่ 4.5) มีสภาวะที่เหมาะสมคือที่เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัมตัวอย่าง และใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ เท่ากับ 0.5018 กรัมต่อ

กรัม ที่สารละลายเบสเข้มข้น 0.4 โมลาร์เท่ากับ 0.3898 กรัมต่อกรัม ที่สารละลายเบสเข้มข้น 0.6 โมลาร์เท่ากับ 0.2981 กรัมต่อกรัม และที่สารละลายเบสเข้มข้น 0.8 โมลาร์เท่ากับ 0.4196 กรัมต่อกรัม เมื่อนำไปทำการย่อยด้วยสภาวะที่กล่าวมาข้างต้นแล้วจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกัน ส่วนการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.6367 กรัมต่อกรัม



รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE1500 ย่อยซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1 โมลาร์

ตารางที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 โดยตัวอย่างที่ปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ และตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์

ความเข้มข้นสารละลาย (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)	
	กรด	เบส
0.2	$0.3633^{a} \pm 0.0580$	$0.5018^{ab} \pm 0.0043$
0.4	$0.5471^{c} \pm 0.0026$	$0.3898^{b} \pm 0.0476$

หมายเหตุ a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DNS ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์ ACCELLERASE1500 โดยตัวอย่างที่ปรับสภาพก่อนทำการย่อยด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ และตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์

ความเข้มข้นสารละลาย (โมลาร์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อกรัม)	
	กรด	เบส
0.6	$0.4249^{b} \pm 0.0017$	$0.2981^{a} \pm 0.0820$
0.8	$0.4216^{b} \pm 0.0247$	$0.4196^{b} \pm 0.0017$
1.0	$0.4248^{b} \pm 0.0130$	$0.6367^{c} \pm 0.0372$

หมายเหตุ a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3.4 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากการทดลองการย่อยซังข้าวโพด ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรด เบส และน้ำกลั่น รวมไปถึงการทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์และนำไปวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในสารที่ได้จากการย่อย ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography ; HPLC) โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปผสมกับสารละลายกลีเซอรอล เข้มข้นร้อยละ 5 ในอัตราส่วน สารตัวอย่างต่อสารละลายกลีเซอรอล เท่ากับ 1 ต่อ 9 จากนั้นกรองสารละลายด้วยตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยเครื่อง HPLC

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยเครื่อง HPLC (ตารางที่ 4.11) พบว่าในตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 0.4 โมลาร์ และย่อยที่สภาวะเวลา 36 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบอื่นๆที่พบในซังข้าวโพด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเฮมิเซลลูโลสที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นโมโนเมอร์ นั้นถูกย่อยและแยกออกไปในขั้นตอนการปรับสภาพ ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น และย่อยที่สภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารที่ได้จากการย่อยนั้นมีทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ แสดงให้เห็นว่าตะกอนที่ปรับสภาพแล้ว ยังมีเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

แต่ในทางกลับกันตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ และย่อยที่สภาวะเวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม นั้นพบได้ทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส (ตารางที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าการใช้ความร้อนและความดันในการปรับ

สภาพร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์นั้น นอกจากจะสามารถกำจัดลิกนินที่เป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้แล้ว ก็ยังเป็นสภาวะที่เหมาะสมและช่วยส่งเสริมให้สามารถได้ชนิด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าสภาวะอื่นๆอีกด้วย (รูปที่ 4.3)

เช่นเดียวกันกับการทดลองของนุศรา และกิ่งกาญจน์ (2547) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์จากกระดาษเหลือใช้ ที่ได้พบว่าองค์ประกอบที่อยู่ในลิกโนเซลลูโลสนั้น มีลิกนินเป็นตัวขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาของเซลลูโลสกับเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส ดังนั้นจึงต้องทำการแยกส่วนประกอบดังกล่าวออกจากโครงสร้างของกระดาษ โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ในการปรับสภาพกระดาษก่อนนำไปย่อย เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* และ *Trichoderms harzianum* ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

และจากงานวิจัยของ Lijuan และคณะ (2015) ที่ได้ทำการศึกษาการปรับสภาพซังข้าวโพดก่อนการย่อยด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ในสภาวะที่เหมาะสมทั้งความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ระยะเวลา อุณหภูมิ และอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบและสารละลาย โดยสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพก่อนการย่อย คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอัตราส่วนซังข้าวโพดต่อสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต เท่ากับ 1 ต่อ 10 โดยทำการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเมื่อนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายอัลคาไลน์โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนตไปย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 12.08 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่าสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและย่อยซังข้าวโพด คือการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ และย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสปริมาณ 0.9 มิลลิลิตรต่อกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นั้นทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าถึง 2.8 เท่า

ส่วนน้ำตาลเซลโลไบโอสที่ไม่พบในสารที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด สารละลายเบส และน้ำกลั่นนั้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลโลไบเอส ซึ่งเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นได้ทำการย่อยน้ำตาลเซลโลไบโอสจนหมด

ตารางที่ 4.10 ชนิดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรด เบส และน้ำกลั่น จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สารที่พบ	กรด	เบส	น้ำกลั่น
น้ำตาลกลูโคส	พบ	พบ	พบ
น้ำตาลไซโลส	ไม่พบ	พบ	พบ
น้ำตาลเซลโลไบโอส	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

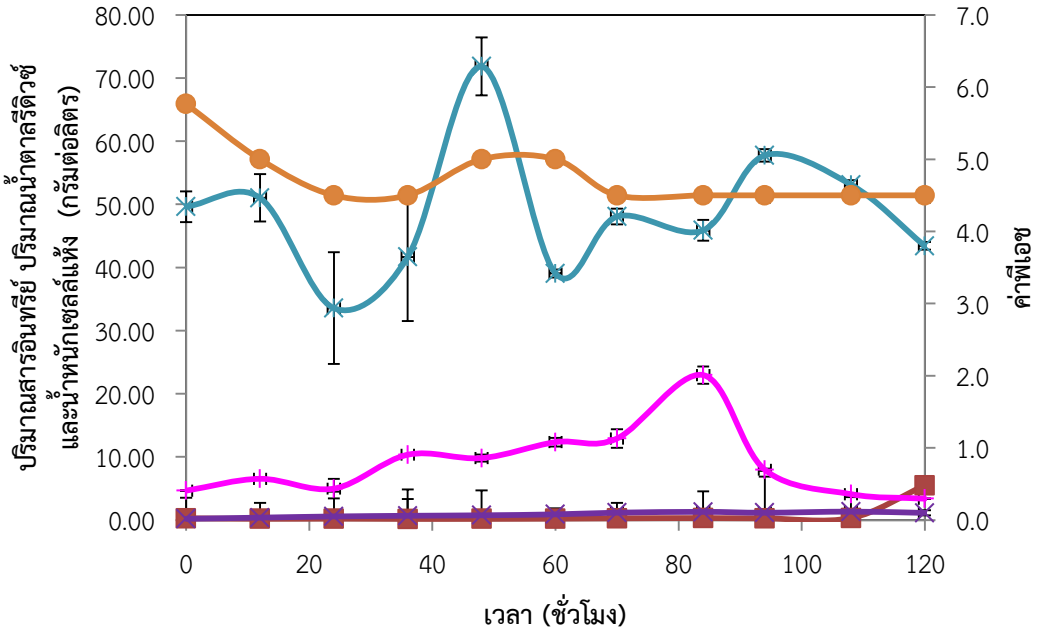
4.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่ใช้แหล่งน้ำตาลจากสารที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยซังข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยเอนไซม์ โดยมีความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และในการทดลองนี้มีชุดควบคุมคืออาหาร GYCC ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการบ่มในแอนแอโรบิกจาร์ (Anaerobic Jar) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งในการเพาะเลี้ยงจะมีการเติมอาหาร GYCC ที่มีปริมาณน้ำตาลความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรทุกครั้งหลังจากที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์หาค่าพีเอชของน้ำหมัก วิเคราะห์หาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักด้วยวิธี DNS และวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์ และตัวทำละลายอินทรีย์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากรูปที่ 4.6 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งน้ำตาล และคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีลักษณะขึ้นลงตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 0 – 70 ชั่วโมง เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อมาถึงที่ช่วงเวลา 84 ชั่วโมง จะพบน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงถึง 22.96 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากทุกเวลาก่อนหน้า และหลังจากนี้ เมื่อผ่านเวลาที่ 84 ชั่วโมง เซลล์จะมีปริมาณที่ลดลง ใกล้เคียงกับช่วงเวลาที่ 0 – 70 ชั่วโมง เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรมทางสถิติ จะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลดังตารางที่ 4.11

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดแทนน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากตัวอย่างที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร จะพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง มีปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ (รูปที่ 4.7) และคำนวณค่าทางสถิติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ยกเว้นในช่วงเวลาที่ 22 ชั่วโมง จะพบน้ำหนักเซลล์แห้งที่มากที่สุดคือ 4.61 กรัมต่อลิตร และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกช่วงเวลาอื่นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงผลดังตารางที่ 4.12

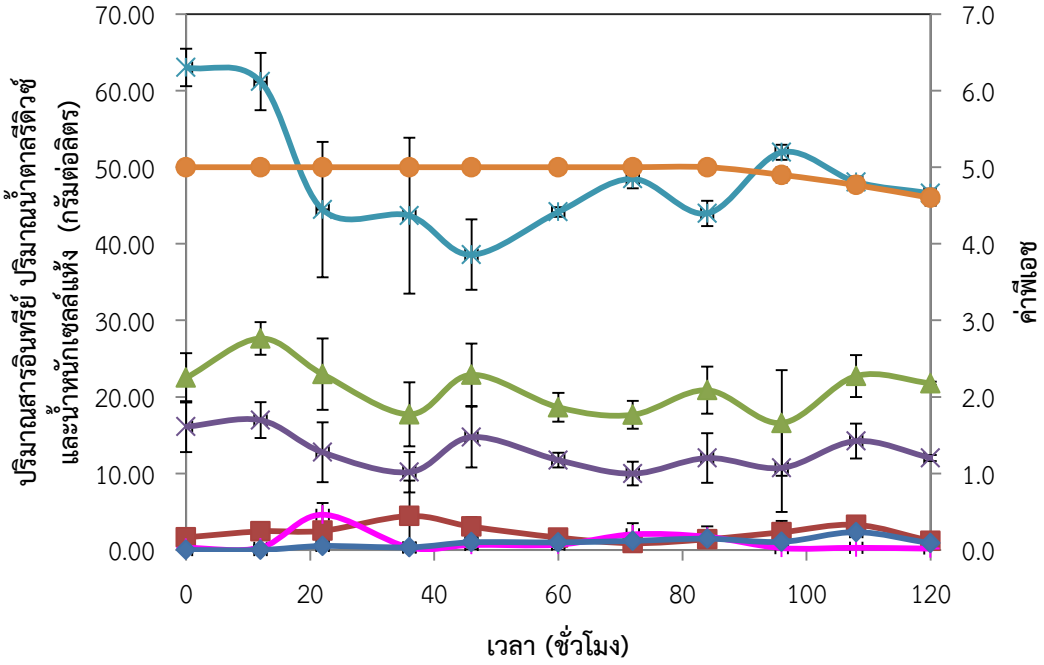
โดยจากการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลจากการย่อยข้าวโพด จะพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลจากการย่อยข้าวโพดจะทำให้เชื้อเจริญได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคส โดยที่เวลา 22 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้นถึง 4.4074 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสมีปริมาณการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยดูจากน้ำหนักเซลล์แห้ง เพียงแค่ 1.06 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอชและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (■ เอทานอล × กรดอะซิติก ✱ น้ำตาลรีดิวซ์ ● ค่าพีเอช + น้ำหนักเซลล์แห้ง)

จากการทดลองในการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ทำการเติมอาหารทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยเติมอาหารในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของตัวอย่างที่เก็บได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.11 และจากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่าที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าน้ำตาล 48.72 กรัมต่อลิตร โดยน้ำตาลมีแนวโน้มคงที่ โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับช่วงเวลาที่ 12 ชั่วโมง ต่อมาช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงจะพบค่าน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 34.10 กรัมต่อลิตร เป็นค่าน้ำตาลที่ต่ำที่ที่สุดของการทดลอง รวมถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับช่วงเวลาอื่นต่อมาในเวลา 36 ชั่วโมงค่าน้ำตาลมีความคงที่และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่เวลาก่อนหน้า ส่วนช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลได้เพิ่มขึ้นอีกครั้งและเป็นจุดสูงสุดของการทดลองที่ 71.67 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับทุกค่าในช่วงการทดลอง และจากช่วงเวลา 48 ชั่วโมงนี้ ปริมาณน้ำตาลจะลดลงอีกครั้งที่เวลา 60 ชั่วโมง เหลือเพียง 42.73 กรัมต่อลิตร และจะมีแนวโน้มที่คงที่ ในช่วงเวลาที่ 60 จนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ความเข้มข้นน้ำตาล 42.73 – 63.05 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 120 ชั่วโมง มีน้ำตาลเหลือ 43.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการทดลองกับน้ำหนักเซลล์แห้ง และการสร้างผลิตภัณฑ์ พบว่าเชื้อได้มีการนำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ (รูปที่ 4.6) มากกว่าการนำไปใช้ในการเจริญ

โดยในส่วนค่าพีเอชนั้น (รูปที่ 4.6) หลังจากทำการทดลองพบว่าค่าพีเอชลดลงจากที่เวลาเริ่มต้นพีเอช 5.8 ลดลงเหลือ 5.0 ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงพีเอชได้ลดลงเหลือ 4.5 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และคงที่จนถึงเวลาที่ 36 ชั่วโมง จากนั้นพีเอชได้มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 5.0 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อคำนวณหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และค่าพีเอชมีค่าคงที่จนถึงเวลาที่ 60 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชได้ลดอีกครั้งเหลือ 4.5 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและคงที่จนจบการทดลองที่เวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC โดยจากรูปที่ 4.10ก แสดงให้เห็นว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ปริมาณกรดอะซิติกนั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับที่ค่าพีเอชเริ่มลดลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อเจริญอยู่ในระยะการสร้างกรดอินทรีย์



รูปที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอชและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYCC ที่มีน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยซังข้าวโพด เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ที่สภาวะนิ่งไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ (◆ อะซิโตน ■ เอทานอล ▲ กรดแลคติก × กรดอะซิติก ✱ น้ำตาลรีดิวซ์ ● ค่าพีเอช + น้ำหนักเซลล์แห้ง)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยข้าวโพด โดยมีการเติมอาหารลงไปทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง ในปริมาตรเท่ากับที่เก็บตัวอย่างไป ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.7 โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลที่ชั่วโมงเริ่มต้นมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญของทั้งการ

ทดลองคือ 63.04 กรัมต่อลิตร และแนวโน้มคงที่จนถึงเวลาที่ 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะอยู่ในช่วง lag phase ของการเจริญ ซึ่งเชื้อเริ่มพบกบอหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ เชื้อจึงปรับตัวให้เข้ากับอาหาร และสิ่งแวดล้อมนั้น ต่อมาในช่วงเวลาที่ 22 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลงถึง 44.46 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 22 ชั่วโมง และหลังจากนั้นที่เวลา 36 – 84 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะอยู่ในช่วง 38 - 48 กรัมต่อลิตร โดยในเวลาชั่วโมงที่ 72 ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์มีความแตกต่างกับช่วงเวลาก่อนและหลังสองช่วงเวลานี้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลา 96 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลได้เพิ่มสูงขึ้นเป็น 51.9464 กรัมต่อลิตร โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และปริมาณน้ำตาลคงที่จนถึงช่วงเวลาที่ 108 ชั่วโมง และลดลงเหลือ 46.60 กรัมต่อลิตร ณ เวลาสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.11 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$4.65^{a} \pm 1.29$	$48.72^{b} \pm 3.89$	$5.8^{c} \pm 0.15$
12	$6.53^{a} \pm 1.55$	$52.36^{bc} \pm 12.22$	$5.0^{b} \pm 0.00$
24	$4.97^{a} \pm 0.80$	$34.10^{a} \pm 1.40$	$4.5^{a} \pm 0.00$
36	$10.34^{a} \pm 4.40$	$39.22^{ab} \pm 6.36$	$4.5^{a} \pm 0.00$
48	$9.81^{a} \pm 2.78$	$71.67^{d} \pm 4.88$	$5.0^{b} \pm 0.00$
60	$12.34^{ab} \pm 7.83$	$42.73^{ab} \pm 10.04$	$5.0^{b} \pm 0.00$
70	$12.91^{ab} \pm 7.54$	$48.95^{b} \pm 3.91$	$4.5^{a} \pm 0.00$
84	$22.96^{b} \pm 7.64$	$44.02^{ab} \pm 5.32$	$4.5^{a} \pm 0.00$
94	$7.97^{a} \pm 4.61$	$63.04^{cd} \pm 13.76$	$4.5^{a} \pm 0.00$
108	$4.10^{a} \pm 1.73$	$51.99^{bc} \pm 4.76$	$4.5^{a} \pm 0.00$
120	$3.38^{a} \pm 1.82$	$43.56^{ab} \pm 1.84$	$4.5^{a} \pm 0.00$

หมายเหตุ a, b, c, d ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยในการเพาะเลี้ยงที่ใช้แหล่งคาร์บอนจากการปรับสภาพ และย่อยซังข้าวโพด (รูปที่ 4.7 และตารางที่ 4.12) จะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และคงที่จนกระทั่งเวลาที่ 96 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะ

ลดลงเหลือ 4.9 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นช่วงเวลาที่ 108 และ 120 ชั่วโมงค่าพีเอชได้ลดลงเหลือ 4.8 และ 4.6 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 4.12 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.28^{a} \pm 0.02$	$63.03^{c} \pm 1.32$	$5.0^{d} \pm 0.00$
12	$0.31^{a} \pm 0.17$	$61.18^{c} \pm 1.28$	$5.0^{d} \pm 0.00$
22	$4.61^{b} \pm 1.54$	$44.46^{ab} \pm 8.85$	$5.0^{d} \pm 0.00$
36	$0.31^{a} \pm 0.04$	$43.67^{ab} \pm 10.17$	$5.0^{d} \pm 0.00$
46	$0.66^{a} \pm 0.57$	$38.57^{a} \pm 4.60$	$5.0^{d} \pm 0.00$
60	$0.70^{a} \pm 0.69$	$44.15^{ab} \pm 0.63$	$5.0^{d} \pm 0.00$
72	$2.04^{a} \pm 1.46$	$48.48^{b} \pm 1.24$	$5.0^{d} \pm 0.00$
84	$1.72^{a} \pm 1.38$	$43.97^{ab} \pm 1.65$	$5.0^{d} \pm 0.00$
96	$0.25^{a} \pm 0.18$	$51.94^{b} \pm 0.98$	$4.9^{c} \pm 0.10$
108	$0.29^{a} \pm 0.20$	$48.08^{b} \pm 0.72$	$4.8^{b} \pm 0.06$
120	$0.18^{a} \pm 0.04$	$46.60^{b} \pm 0.61$	$4.6^{b} \pm 0.10$

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f, g ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งน้ำตาล กับชุดควบคุม นั้นพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงที่ใช้ซังข้าวโพดนั้นมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม เนื่องจากในการทำการทดลองหลังที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ และควบคุมค่าพีเอชด้วยบัฟเฟอร์แล้ว ไม่ได้ทำการปรับค่าพีเอชของอาหาร GYCC จึงทำให้ค่าพีเอชเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงที่ใช้ซังข้าวโพดนั้นมีค่าต่ำเกินไปไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงทำให้เชื้อสร้างกรดอินทรีย์ในปริมาณที่น้อยมากในระยะการสร้างกรดอินทรีย์

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งน้ำตาล และวิเคราะด้วยเครื่อง HPLC (รูปที่ 4.6) พบว่าที่เวลาเริ่มต้น มีปริมาณกรดอะซิติกน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ในทุกช่วงเวลาคือ 0.18 กรัมต่อลิตร จากนั้นปริมาณกรดอะซิติกที่พบจะมีค่าที่ขึ้นและลงในระหว่างช่วง 12 – 94 ชั่วโมง โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากนั้นเมื่อเวลาที่ 108 ชั่วโมง จะพบปริมาณกรดอะซิติกที่มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ

1.33 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดอะซิติกมีค่าค่อนข้างคงที่จนกระทั่งที่เวลาสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลของเอทานอล จะพบว่าค่าของเอทานอลเริ่มต้นคือ 0.2808 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มคงที่จนถึงช่วงเวลาที่ 108 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.6 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จนกระทั่งระยะเวลาที่ 120 ชั่วโมง พบปริมาณเอทา-นอลที่มากที่สุดจากการวิเคราะห์ผล คือ 5.47 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.13 ความเข้นข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นเอทานอล ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งน้ำตาล

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
0	$0.18^{a} \pm 0.01$	$0.28^{a} \pm 0.02$
12	$0.38^{ab} \pm 0.06$	$0.19^{a} \pm 0.02$
24	$0.56^{bc} \pm 0.02$	$0.22^{a} \pm 0.00$
36	$0.67^{cd} \pm 0.10$	$0.18^{a} \pm 0.00$
48	$0.75^{cd} \pm 0.03$	$0.18^{a} \pm 0.02$
60	$0.90^{d} \pm 0.08$	$0.22^{a} \pm 0.02$
70	$1.16^{e} \pm 0.27$	$0.27^{a} \pm 0.06$
84	$1.30^{e} \pm 0.18$	$0.31^{a} \pm 0.02$
94	$1.15^{e} \pm 0.12$	$0.27^{a} \pm 0.03$
108	$1.33^{e} \pm 0.25$	$0.31^{a} \pm 0.07$
120	$1.12^{e} \pm 0.03$	$5.47^{b} \pm 0.58$

หมายเหตุ a, b, c, d, e ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในส่วนของการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ ด้วยอาหาร GYCC ที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งน้ำตาลพบว่าปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้นคือ 16.11 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7) ซึ่งในการเพาะเลี้ยงด้วยสารที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเอนไซม์เซลลูเลสนั้นมีปริมาณของกรดอะชิ-ติกเริ่มต้นที่ค่อนข้างสูง เนื่องจากในกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ในการควบคุมค่าพีเอช จึงทำให้พบปริมาณกรดอะซิติกที่ช่วงเวลาเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงและได้เพิ่มสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณกรดอะซิตริกได้ลดลงในช่วงเวลาที่ 22 ชั่วโมง เหลือเพียง 12.7631 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มที่คงที่ตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 22 – 120 ชั่วโมง โดยพบค่า

ปริมาณกรดอะซิติกต่ำสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 72 และเมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์จะพบว่า ปริมาณกรดอะซิตริกอยู่ที่ 12.03 กรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์น้ำหมัก จะได้ค่าความเข้มข้นกรดแลคติก (รูปที่ 4.7) โดยมีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 22.49 กรัมต่อลิตร จากนั้นค่าได้เพิ่มขึ้นถึง 27.62 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณที่พบสูงที่สุดในการวิเคราะห์กรดแลคติกจากทุกชั่วโมง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ต่อมาค่าความเข้มข้นของกรดแลคติกมีการขึ้นลง และเริ่มคงที่จนกระทั่งถึงเวลาที่ 96 ชั่วโมง จะพบปริมาณกรดแลคติกลดลงต่ำที่น้อยที่สุดคือ 16.58 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 108 จะพบค่าปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มสูงขึ้นเป็น 22.72 กรัมต่อลิตร และเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงจะพบปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 21.77 กรัมต่อลิตร

จากเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่าในระยะการสร้างกรดอินทรีย์ เชื้อจะมีการสร้างกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก จากในการทดลองนี้ เมื่อวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักด้วยเครื่อง HPLC แล้วพบว่าเชื้อสร้างเพียงแค่กรดแลคติก และกรดอะซิติก แต่กลับไม่พบปริมาณกรดบิวทิริก เนื่องจากค่าพีเอชเริ่มต้นของน้ำหมักนั้นเท่ากับ 5 ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างกรดบิวทิริกได้ โดยจากการศึกษาของสุนทร และคณะ (2555) แสดงให้เห็นว่าน้ำหมักที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.5 นั้นจะทำให้เชื้อสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้มากที่สุด

ตารางที่ 4.14 ความเข้นข้นกรดอะซิติก และความเข้มข้นกรดแลคติก ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)
0	$16.11^{bc} \pm 3.32$	$22.49^{ab} \pm 3.21$
12	$16.96^{c} \pm 2.35$	$27.62^{b} \pm 2.13$
22	$12.76^{abc} \pm 3.92$	$22.97^{ab} \pm 4.66$
36	$10.17^{ab} \pm 2.63$	$17.72^{a} \pm 4.20$
46	$14.74^{abc} \pm 3.97$	$22.88^{ab} \pm 4.07$
60	$11.74^{abc} \pm 0.96$	$18.64^{a} \pm 1.87$
72	$9.97^{a} \pm 1.55$	$17.66^{a} \pm 1.82$
84	$12.01^{abc} \pm 3.23$	$20.86^{ab} \pm 3.07$
96	$10.72^{ab} \pm 5.73$	$16.58^{a} \pm 6.91$
108	$14.23^{abc} \pm 2.28$	$22.72^{ab} \pm 2.75$
120	$12.03^{abc} \pm 0.40$	$21.77^{ab} \pm 0.20$

หมายเหตุ a, b, c ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลจะพบว่า ปริมาณเอทานอลที่ 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 1.6481 กรัมต่อลิตร ต่อมาค่าปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเวลาที่ 36 ชั่วโมงจะได้ค่าที่สูงสุด คือ 4.44 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาต่อมาค่าจะเริ่มลดลงจนกระทั่งเวลาที่ 72 ชั่วโมง จะได้ค่าปริมาณเอทานอลต่ำสุดคือ 0.89 กรัมต่อลิตร หลังจากเวลานี้ปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้นอีกครั้งจนเวลาชั่วโมงที่ 108 ได้ค่าเป็น 3.28 กรัมต่อลิตร และที่ชั่วโมงสุดท้ายค่าปริมาณเอทานอลได้ลดลงเหลือ 1.17 กรัมต่อลิตร โดยผลของเอทานอลมาจากการใช้บัฟเอร์อะซิเตตที่มีส่วนผสมของกรดอะซิติกและเชื้อผลิตกรดนี้ขึ้น ทำให้มีปริมาณกรดอะซิติกในปริมาณมากและสามารถสร้างผลิตภัณฑ์เอทานอล (รูปที่ 4.7)

ตารางที่ 4.15 ความเข้นข้นเอทานอล และความเข้มข้นอะซิโตน ที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นอะซิโตน (กรัมต่อลิตร)
0	$1.65^{ab} \pm 0.54$	$0.00^{a} \pm 0.00$
12	$2.43^{ab} \pm 0.39$	$0.00^{a} \pm 0.00$
22	$2.51^{ab} \pm 1.08$	$0.52^{bc} \pm 0.01$
36	$4.44^{b} \pm 4.65$	$0.35^{ab} \pm 0.08$
46	$3.05^{ab} \pm 1.23$	$0.99^{d} \pm 0.08$
60	$1.62^{ab} \pm 0.80$	$0.99^{d} \pm 0.21$
72	$0.89^{a} \pm 0.21$	$1.20^{de} \pm 0.08$
84	$1.40^{ab} \pm 0.93$	$1.48^{e} \pm 0.02$
96	$2.31^{ab} \pm 1.47$	$1.06^{de} \pm 0.76$
108	$3.28^{ab} \pm 0.79$	$2.33^{f} \pm 0.09$
120	$1.17^{a} \pm 0.37$	$0.87^{cd} \pm 0.09$

หมายเหตุ a, b, c, d, e, f ในแถวแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซิโตนที่วัดได้จากการเพาะเลี้ยง *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยตัวอย่างซังข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่า เวลาเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 12 จะไม่พบปริมาณอะซิโตน ต่อมาเมื่อเวลา 22 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7) ซึ่งมีความสอดคล้องกันกับปริมาณกรออะซิติกที่ลดลงในชั่วโมงที่ 22 (รูปที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการนำกรดอะซิติกไปใช้ และเปลี่ยนเป็นอะซิโตน จะพบปริมาณอะซิโตนอยู่ที่ 0.52 กรัมต่อลิตร ต่อมาปริมาณอะซิโตนได้ลดลงเล็กน้อยเหลือ 0.35 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ก่อนจะเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่เวลา 46 – 96 ชั่วโมงด้วยแนวโน้มที่คงที่

และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 108 จะพบปริมาณอะซิโตนที่มากสุดอยู่ที่ 2.33 กรัมต่อลิตร โดยชั่วโมงสุดท้ายจะพบค่าที่ลดลงเหลือ 0.87 กรัมต่อลิตร

ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้จะไม่ประความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตบิวทานอล แต่จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งน้ำตาลสามารถทำให้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้จำนวนชนิดมากกว่า กล่าวคือ การเพาะเลี้ยงที่ใช้น้ำตาลกลูโคสนั้นพบว่ามีการสร้างผลิตภัณฑ์เพียงแค่สองชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก และเอทานอล แต่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโต เป็นการแสดงให้เห็นว่าเชื้อนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่ไม่นำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ใช้ซังข้าวโพดทำให้เชื้อผลิตได้ทั้งกรดอะซิติก กรดแลคติก เอทานอล และอะซิโตน แต่อย่างไรก็ตามอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้การเพาะเลี้ยงที่ใช้ซังข้าวโพดนั้นสามารถผลิตอะซิโตนได้ เนื่องจากในอาหารใช้ในการเพาะเลี้ยงนั้นมีกรดอะซิติกเป็นส่วนผสมด้วย ซึ่งได้จากการใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการย่อย จึงทำให้มีปริมาณของสารตั้งต้นในการผลิตอะซิโตนมากกว่าชุดควบคุม

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อการศึกษาแหล่งน้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ และย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบพบว่า ซังข้าวโพดมีองค์ประกอบทางเคมีเป็น เยื่อใยหยาบร้อยละ 39.19 ไขมันร้อยละ 5.28 ความชื้นร้อยละ 4.58 เถ้าร้อยละ 1.89 และโปรตีนร้อยละ 0.04 นอกจากนี้ ยังมีปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 31.04 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 27.12 และลิกนินร้อยละ 4.24

เมื่อนำซังข้าวโพดที่ผ่านการร่อนมาปรับสภาพด้วยกรดและเบสความเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ และน้ำกลั่น โดยปรับสภาพจะใช้อัตราส่วนซังข้าวโพดต่อสารละลายคือ 1 : 10 มาทำการนึ่งด้วยไอน้ำร้อนแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เมื่อวิเคราะห์ของเหลวที่ได้จากการปรับสภาพ ก่อนทำการย่อย ของเหลวจากการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการปรับสภาพด้วยสารอื่น คือ 55.14 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ส่วนของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์นำมาทำการปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่นปกติใช้ปริมาตรน้ำล้างปกติ 1500 mL และใช้น้ำล้างสลับ 922 mL การล้างแบบสลับจะดีที่สุดเนื่องจากประหยัดน้ำกว่า เมื่อนำของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการย่อย ด้วยการใช้ปริมาตรเอนไซม์ 0 – 1.0 มิลลิลิตร ต่อปริมาณตัวอย่าง 1 กรัม ในสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 ชั่วโมงปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ 0.71 กรัมต่อกรัม

จากนั้นนำของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดนี้ มาทำการย่อยโดยใช้น้ำประปาแทนอะซีเตตบัฟเฟอร์ที่เวลา 48 ชั่วโมง ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 มิลลิลิตร พบว่าการใช้น้ำประปาจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าการใช้บัฟเฟอร์ แต่เนื่องจากค่าพีเอชของน้ำประปาในแต่ละครั้งที่ทำการทดลองมีค่าไม่เท่ากันจึงสามารถนำมาใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมได้ เพราะในการใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาต้องมีการควบคุมค่าพีเอช เนื่องจากค่าพีเอชคือหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งในการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะต้องมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น เพื่อให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่จากการทดลองต้องมีการควบคุมพีเอชจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ และทำการทดลองอีกครั้งโดยใช้ความเข้มข้นสารละลายต่างกันที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ของแข็งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเบสได้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดที่ 0.64 กรัมต่อกรัม นำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์

ตัวอย่างด้วย HPLC จะพบว่าชนิดน้ำตาลที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายเบส พบน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ในขณะที่ตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายกรดและน้ำกลั่น พบน้ำตาลกลูโคส เพียงอย่างเดียว ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร จากชุดควบคุมใช้ อาหาร GYCC และใช้น้ำตาลจากกลูโคส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 84 ชั่วโมงคือ 22.96 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 71.67 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาเริ่มต้นมีพีเอชมากที่สุดที่ 5.8 พบกรดอะซิติกและเอทานอลอยู่ที่ 108 ชั่วโมงความเข้มข้น 1.33 กรัมต่อลิตรและที่ 120 ชั่วโมง ความเข้มข้น 5.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนจากอาหาร GYCC โดยใช้น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 22 ชั่วโมงคือ 5.20 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาที่ 0 ชั่วโมง ได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 63.04 กรัมต่อลิตร ช่วงเวลาเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 มีพีเอชมากที่สุดที่ 5.0 พบกรดอะซิติก กรดแลคติก เอทานอล และอะซิโตน อยู่ที่ 12 ชั่วโมง ความเข้มข้น 16.96 กรัมต่อลิตร ที่ 12 ชั่วโมง ความเข้มข้น 27.62 กรัมต่อลิตร ที่ 36 ชั่วโมงความเข้มข้น 4.44 กรัมต่อลิตร และที่ 108 ชั่วโมง ความเข้มข้น 2.33 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สรุปได้ว่าเชื้อนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตโดยผลิตกรดอะซิติก แลคติก และอะซิโตน สร้างผลิตภัณฑ์เอทานอล แต่ไม่สร้างผลิตภัณฑ์บิวทานอล เนื่องจากไม่มีการผลิตกรดบิวทิริกหรือผลิตได้ปริมาณน้อยมาก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทดลองในอาหารสูตรอื่นๆ เนื่องจากอาหารแต่ละสูตรถึงแม้จะมีองค์ประกอบหลักที่คล้ายกัน เช่น แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน แต่อาจจะมีสารอาหารบางตัว เช่น วิตามิน หรือเกลือแร่บางชนิดที่แตกต่างกัน ซึ่งชนิดและอัตราส่วนของสารอาหารที่แตกต่างกันนี้ อาจมีผลต่อกลไกการสร้างผลิตภัณฑ์

2. ควรมีการควบคุมค่าพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

3. ทดลองการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆในการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อหลีกเลี่ยงการสร้างผลิตภัณฑ์จากแหล่งคาร์บอนอื่น นอกเหนือจากสารตั้งต้นที่ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. "**การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า.**" กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2555. **โครงการศึกษาความเป็นไปได้ ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กรมวิชาการเกษตร. 2558. **ธัญพืชมากประโยชน์ข้าวโพดข้าวเหนียวสีม่วง.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://it.doa.go.th/pibai/pibai/n14/v_11-dec/rai.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2548. **ธัญพืชและผลิตภัณฑ์.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/cereals/02.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

ก่องกานดา ชยามฤต. 2540. **สมุนไพรไทยตอนที่ 6.** กรุงเทพฯ : ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. 2557. **บทที่ 3 เทคนิคอาหารสัตว์เคี้ยว เอื้อง.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://elearning.nsru.ac.th/web_elearning/dairy/lesson3_8.php. (19 พฤศจิกายน 2558).

โครงการเผยแพร่ข้อมูลทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นบนพื้นที่สูง. 2558. **Maize - Indian Corn, Maize.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=505&name=-%20Maize%20-%20Indian%20Corn,%20Maize%20[1]&txtSearch=&sltSearch=. (18 พฤศจิกายน 2558).

คนึงศักดิ์ เจีนรนัยกุล, ตารุวัฒน์ มงคลธนทรรศ, สาทิส เวณุจันทร์, มงคล จุ่นเฮ้า, มานพ คันธามารัตน์, สุทิน จูฑะสุวรรณ, ทองหยด จีราพันธ์, บาลทิตย์ ทองแดง, ทรงยศ จันทรมานิตย์ และวีระ สุขประเสริฐ. ม.ป.ป. "พัฒนาเครื่องเกี่ยวข้าวโพดเลี้ยงสัตว์." รายงานการวิจัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมีคณะวิศวกรรมศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิณห์จุฑา ฤกษ์เกษม, วรรณยุพา ไวกุลเพ็ชร และวรรัตน์ จุนเจือทรัพย์. 2555. "การศึกษาแหล่งน้ำตาลราคาถูกเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462" ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2556. "**ข้าวโพด.**" หน้า 62-64. หนังสือสมุนไพรลดไขมันในเลือด 140 ชนิด. กรุงเทพฯ : ปนิดา เกิดดอนแฝก.

ชนิกา อื้อพานิช, ชมภูนุช วิรุณานนท์ และวรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2555. “ไบโอบิวทานอล : เชื้อเพลิงเหลวที่กำลังจะมาทดแทนเอทานอล.” **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**. 22(3) : 703-709.

ชูศักดิ์ จอมพุก. 2542. “**ข้าวโพด.**” หน้า 30-49. ใน นพพร สายัมพล, เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ และสนธิชัย จันทร์เปรม. พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

ทวีศักดิ์ ภู่หลำ. 2540. “**หน่วยที่ 6 การจัดการการผลิตข้าวโพด.**” หน้า 529-626. ใน สุมิตรา โภชนา และสมพิศ นิชลานนท์. การจัดการการผลิตธัญพืชและพืชอาหารสัตว์. สาขาวิชาส่งเสริมการ เกษตรและสหกรณ์.

นิจศิริ เรืองรังษี และธวัชชัย มังคละคุปต์. 2547. “**ข้าวโพด (Khao Pod).**” หน้า 64. หนังสือสมุนไพรไทย. เล่มที่1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บี เฮลท์ตี้.

เนติศักดิ์ ชูเอี่ยม. 2555. **ข้าวโพด.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://pirun.ku.ac.th/~b5310103112/index.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

นภา โล่ห์ทอง, สุนีย์ โชตินีรนาท, กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2536. "การใช้ประโยชน์จากซังข้าวโพดโดยจุลินทรีย์." หน้า 62-74. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาคหกรรมศาสตร์ วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร เศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม 3-6 กุมภาพันธ์ 2536**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นัย บำรุงเวช. 2555, 1 พฤศจิกายน "เทคโนฯ ก้าวหน้า." นัย บำรุงเวช. **มติชนรายวัน.** หน้า 74

นุศรา จักษุทิพย์ และกิ่งกาญจน์ ม่วงไหมทอง. 2547. “การผลิตแอลกอฮอล์จากกระดาษเหลือใช้.” มหาวิทยาลัยรังสิต

บุญฤทธิ ศิริสม และเอกชัย ครองยุติ. 2553. “การศึกษาผลของความเร็วรอบและขนาดตะแกรงของเครื่องลด ขนาดแบบ Hammer Mill ทีมีผลต่อการลดขนาดซังข้าวโพด.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บุษยมาศ เหมณี. 2554. "กระบวนการปรับสภาพน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประภาส วีระแพทย์, สุทัศน์ ศรีวัฒนพงษ์, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2520. **ข้าวโพด.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=3&chap&page=t3-2-infodetail03.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

พิกุลทอง ไชยมงคล. 2555. **ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์1. เชียงใหม่:** วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

พัฒนา เหล่าไพบูลย์, ลักขณา เหล่าไพบูลย์, วิชัย ลีลาวัชรมาศ และประสิทธิ์ ใจศีล. 2550. “การผลิตบิวทานอลจากข้าวฟ่างหวานโดยแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* ด้วยวิธีการหมักแบบกะและกึ่งกะ.” รายงานการวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิเชษฐ์ กรุดลอยมา และสุรพงษ์ ประสิทธิ์วัฒนเสวี. 2557. **ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.arda.or.th/kasetinfo/north/plant/fcorn.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2539. **หลักการอาหารสัตว์ หลักโภชนาศาสตร์และการประยุกต์.** เชียงใหม่ : ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. "การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพศาล หิรัญมาศสุวรรณ. 2555. **ภาพต้นข้าวโพดที่เจริญเติบโตเต็มที่.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.ablewaterpump.com/web/allcontent/famer1/430-mydream. (18 พฤศจิกายน 2558).

ไพโอเนียร์. 2557. **วิธีการปลูกข้าวโพดให้ได้ผลผลิตสูงและคุณภาพดี.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.pioneer.com/web/site/thailand/resources/indiv-tech-sheets/. (19 พฤศจิกายน 2558).

มาโนชญ์ เพ็ชรดี. 2554. **ภาพข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่เก็บเกี่ยวมาจากต้นแล้ว.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://manoch-arti3314.blogspot.com/. (19 พฤศจิกายน 2558).

ราเชนทร์ ถิรพร. 2541. **ข้าวโพด.** กรุงเทพฯ : ภาวิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2541. “**ข้าวโพด.**” หน้า 12-19. ใน วาสนา วงษ์ใหญ่, อุดม พูลเกษ , รังสฤษฏ์ กาวีต๊ะ และวิทยา แสงแก้วสุข. พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลลิดา นิทัศนจารุกุล. 2541. “**ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อ Cellulase Activity ในดินนาข้าว.**” โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2558. **ภาพลักษณะส่วนต่างๆ ของข้าวโพด(*Zea mays*).** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://th.wikipedia.org/wiki/ข้าวโพด. (19 พฤศจิกายน 2558).

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2542. “**ข้าวโพด.**” หน้า 114-120. หนังสือพจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : รวมสาส์น.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2548. **พจนานุกรมสมุนไพรไทย.** พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพ ฯ : รวมสาส์น.

วิทยา บุญวรพัฒน์. 2554. “**ข้าวโพด.**” หน้า 128. ใน นุชนาถ บุยวรพัฒน์, ณฐมณ ปิ่นถาวร, วรัตม์ เวช เหรียญเดชาเวชกุล และธงชัย ลี้นำโชค. หนังสือสารานุกรมสมุนไพรไทย-จีน ที่ใช้บ่อยในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย.

ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. 2558. **ภาพแปลงปลูกข้าวโพด.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.doa.go.th/fcrc/nsn/pns3seedprod.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

สถิดา ไกรลาศ. 2536. “การเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายในกระบวนการหมักอะซีโตนบิวทานอลโดยระบบต่อเนื่องแบบสองขั้นตอน.” โครงงานพิเศษ วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกระทรวงพลังงาน. 2551. **การศึกษาเปรียบเทียบเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลของสหรัฐอเมริกาและไทย**. สมุทรปราการ: พิมพ์พินิจ การพิมพ์.

สุนทร กาญจนเทวี. 2537. “ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสารละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะด้วยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* จากกากน้ำตาล.” รายงานการวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุนทร กาญจนทวี และอภิชัย สาวิสิทธิ์. 2555. “การศึกษาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (เอบีอี) จากมันสำปะหลังโดยกระบวนการหมัก.” รายงานการวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุรีพร เกตุงาม. 2543. **เอกสารประกอบการสอนวิชาธัญพืช.** อุบลราชธานี : ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

เอกชัย ครองยุติ และบุญฤทธิ์ ศิริสม. 2553. "การศึกษาผลของความเร็วรอบและขนาดตะแกรงของเครื่องลดขนาดแบบ Hammer Mill ที่มีผลต่อการลดขนาดซังข้าวโพด." ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2555. **เทคโนโลยีของเอนไซม์.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพ ฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกกล้าคุณทหารลาดกระบัง

อารี ฤทธิบูรณ์, วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ และดวงกมล เรือนงาม. 2556. "**เอกสารประกอบการเรียนวิชาปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี.**" โครงการตำรา : คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

โอวาท จุฑานนท์. 2513. “**ข้าวโพด.**” หน้า 166. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อิสรี รอดทัศนา. 2550. การปรับสภาพกากตะกอนเยื่อกระดาษเหลือทิ้งขั้นต้นเพื่อผลิต.เอทานอล. จากกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์และการหมัก. วิทยานิพนธ์วิศวกรรม

ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

Abd-Alla, M. H. and El-Enany, A. E. 2012. “Production of acetone-butanol-ethanol from spoilage date plam (*Phoenix dactylifera* L.) fruit by mixed culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Bacillus subtilis*.” **Biomass and bioenergy**. 42 : 172-178.

Benette และLeitch. 2005. **ภาพฝักข้าวโพดสายพันธุ์ต่างๆที่มีสีสันแตกต่างกัน.** [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/cereals/02.html. (18 พฤศจิกายน 2558).

Dürre, P. 2008. “Fermentative butanol production.” **Annals of the New York Academy of Sciences**. 1125 : 353-362.

Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H. 1987. **Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs.** Berlin : Springer.

Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., Yang, S., and Jiang, W. 2009. "Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium." **Microbiology and Biotechnology**. 36 : 1225-1232.

Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Suka-Aho, M. and Viikari, L. 2005. Characterization of Cellulose and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon.sources. **Process Biochemistry.** 3519 - 3525.

Kai, G. and Lars, R. 2014. "ABE fermentation from enzymatic hydrolysate of NaOH-pretreated corncobs." **Biomass and Bioenergy.** 66 : 110 -115.

Lijuan, M., Youzhi, C., Rui ,C., Xueqiang, L., Cuiying, Z. and Dongguang, X. 2015. "Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corncob." **Bioresource Technology.** 180 : 1- 6

Parisi, F. 1989. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.** 38: 53-87.

Schuster, K. C., Van den Heuvel, R., Gutierrez, N. A., and Maddox, I. S. 1998. "Development of markers for product formation and cell cycle in batch cultivation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 49 : 669-676.

Sun, Y. and Cheng, J.J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production. **Bioresource Technology**. 83 : 1-11.

Thang, V., Kanda, K., and Kobayashi, G. 2010. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava by *Clostridium saccharoperbutyl-acetonicu* N1-4. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 161 : 157-170.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ข้อมูลการเตรียมสารและกราฟมาตรฐาน

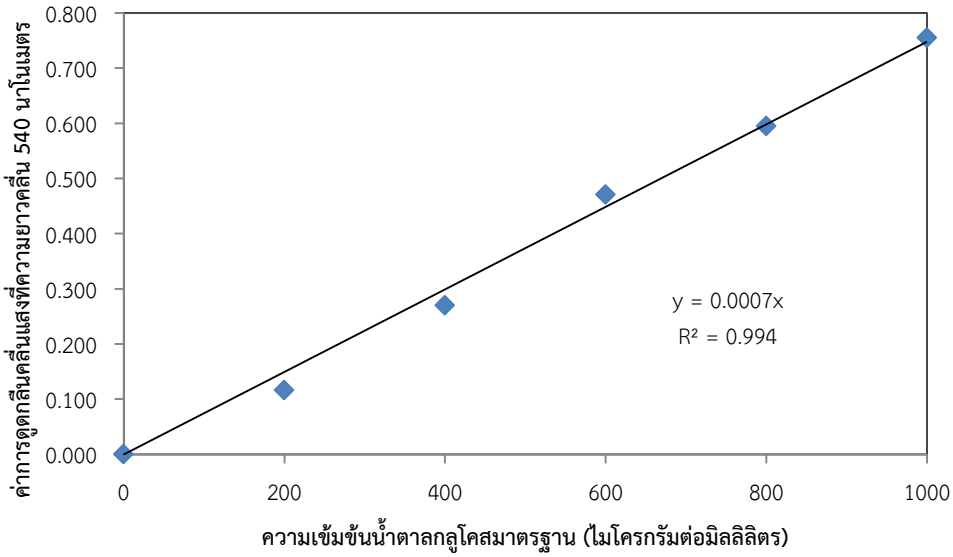
ข้อมูลกราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์

การเตรียมสารละลายกลูโลสมาตรฐาน

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

ตารางที่ ก.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method)

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
0	0.000
200	0.116
400	0.270
600	0.471
800	0.595
1000	0.755

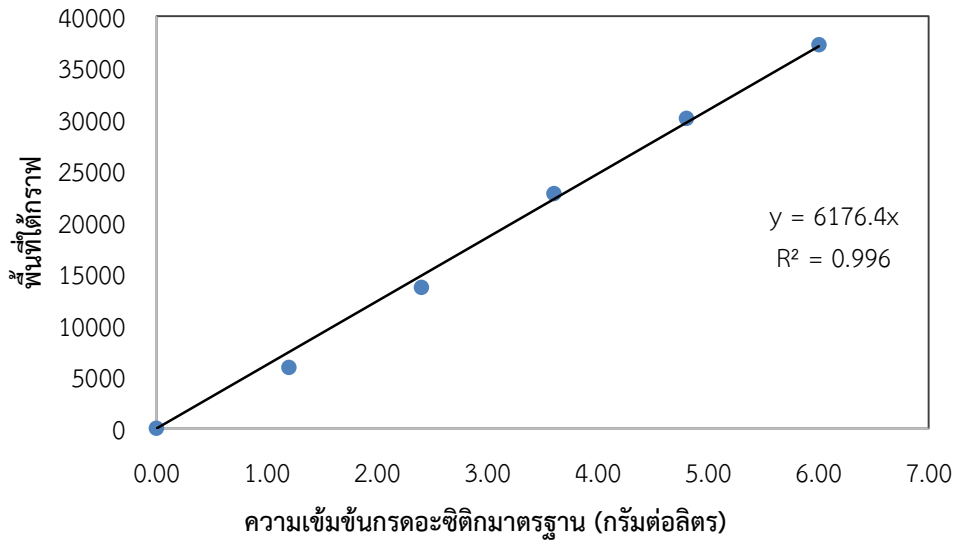


รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS

ข้อมูลกราฟมาตรฐานสารอินทรีย์

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

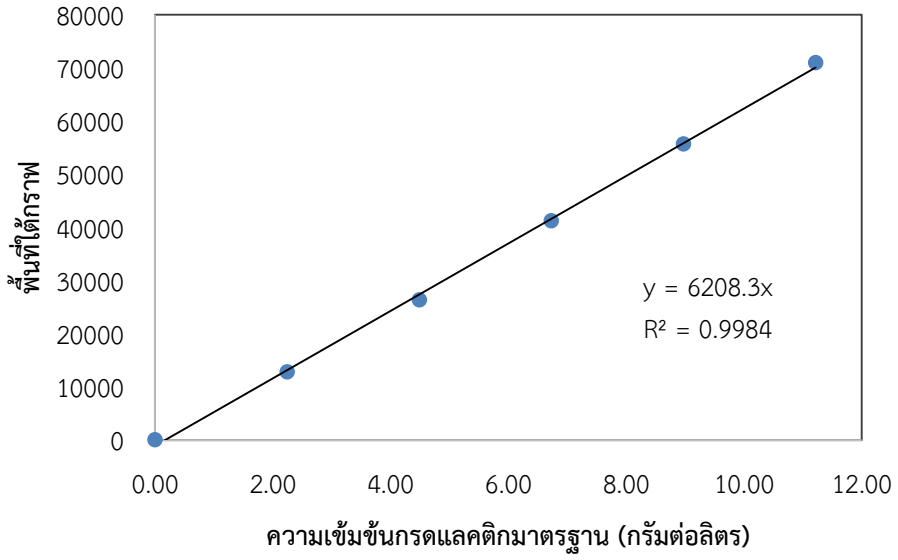
ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นกรดอะซิติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0.00	0
0.02	1.20	5909
0.04	2.40	13668
0.06	3.60	22791
0.08	4.80	30066
0.10	6.01	37220



รูปที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดอะซิติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ ก.3 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกรดแลคติกมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิลิเมตร ความยาว 150 มิลลิลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

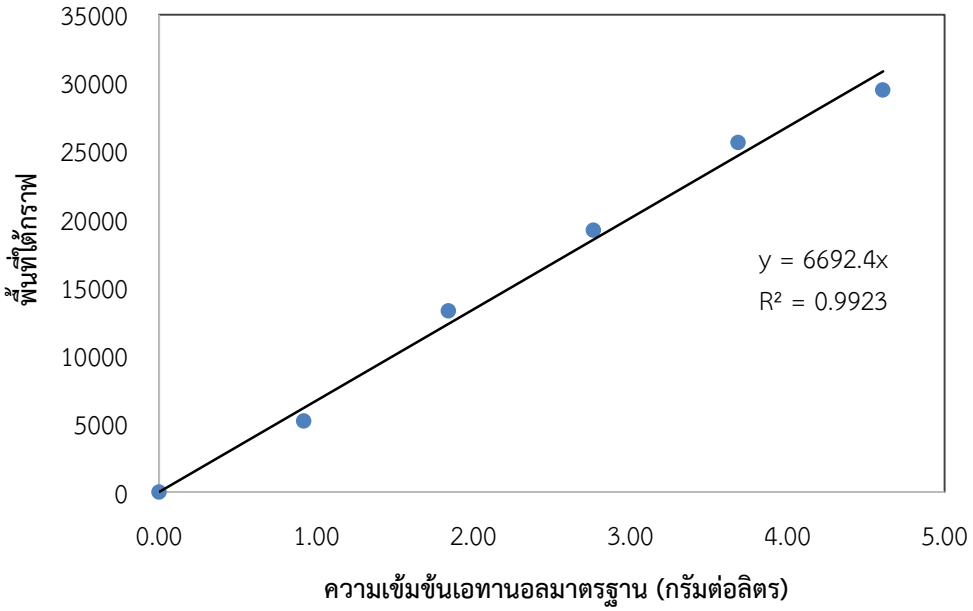
ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นกรดแลคติกมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0.00	0
0.02	2.24	12798
0.04	4.49	26314
0.06	6.73	41206
0.08	8.98	55634
0.10	11.22	70930



รูปที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแลคติก ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

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

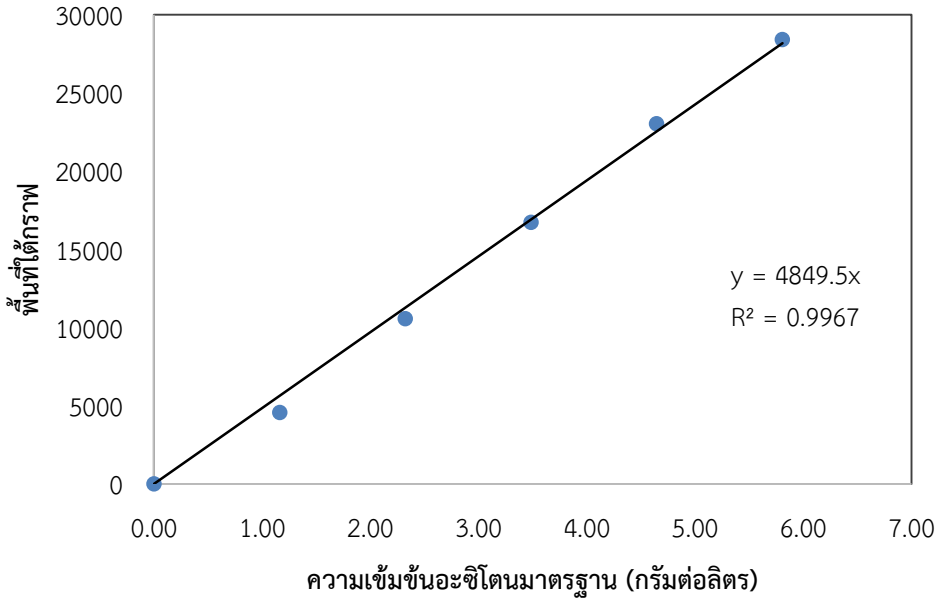
ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นเอทานอลมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0.00	0
0.02	0.92	5200
0.04	1.84	13284
0.06	2.76	19197
0.08	3.69	25621
0.10	4.61	29476



รูปที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

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

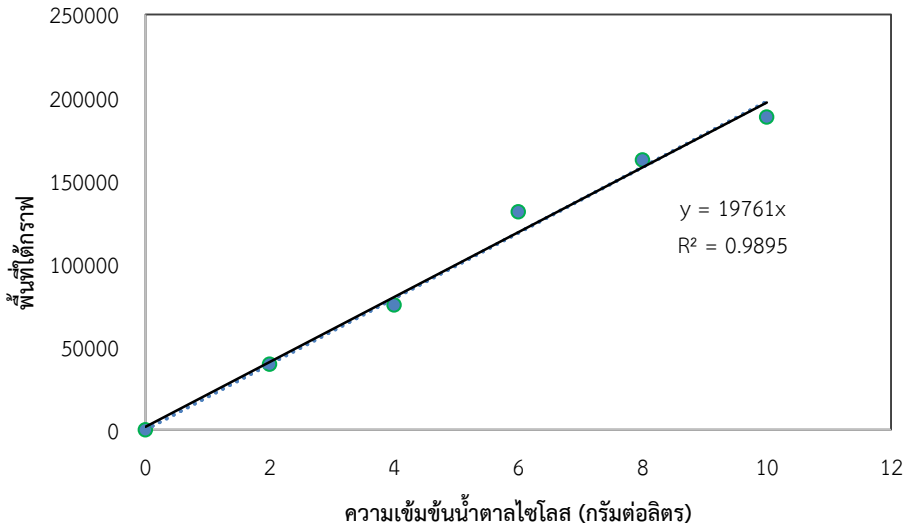
ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (โมลาร์)	ความเข้มข้นอะซิโตนมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0.00	0
0.02	1.16	4554
0.04	2.32	10561
0.06	3.48	16714
0.08	4.65	23006
0.10	5.81	28397



รูปที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอล ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

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

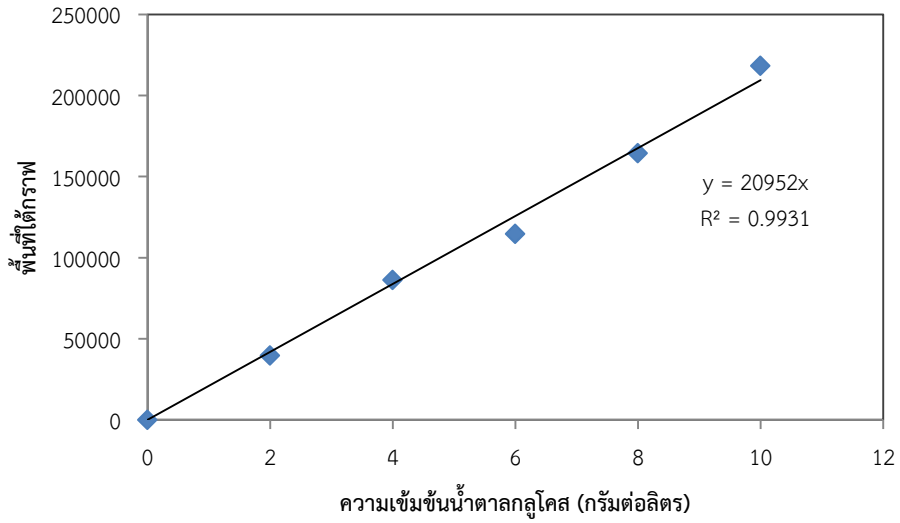
ความเข้มข้นไซโลสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0
2.00	172943
4.00	364811
6.00	632983
8.00	729231
10.00	837117



รูปที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายไซโลส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ ก.7 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Amines® Fermentation Monitor ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิลิเมตร ความยาว 150 มิลลิลิเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ (column oven) ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส และความดัน 450 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

ความเข้มข้นกลูโคสมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ
0.00	0
2.00	39665
4.00	86114
6.00	114603
8.00	164399
10.00	218288



รูปที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส ซึ่งทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากของเหลวจากการปรับสภาพก่อนทำการย่อยผงซังข้าวโพดด้วยกรดซัลฟิวริก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 โมลาร์

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	โมลาร์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
ของเหลวกรด	0.2	4	55.142875	.7094858	.3547429
	0.4	4	29.857150	.2020440	.1010220
	0.6	4	32.178550	1.7394223	.8697111
	0.8	4	54.214300	1.5364178	.7682089
	1.0	4	52.964275	4.5942342	2.2971171
	รวม	20	44.871430	11.8330648	2.6459537
ของเหลวเบส	0.2	4	1.876075	.1104759	.0552379
	0.4	4	1.414100	.1683217	.0841608
	0.6	4	1.309650	.0648112	.0324056
	0.8	4	1.106075	.1968500	.0984250
	1.0	4	.856075	.2594229	.1297114
	รวม	20	1.312395	.3816786	.0853459

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
ของเหลวกรด	6.502	4	15	.003
ของเหลวเบส	2.354	4	15	.101

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ของเหลวกรด	Between Groups	2579.295	4	644.824	119.247	.000
	Within Groups	81.112	15	5.407		
	Total	2660.407	19			
ของเหลวเบส	Between Groups	2.316	4	.579	19.195	.000
	Within Groups	.452	15	.030		
	Total	2.768	19			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
ของเหลวกรด	Welch	1066.909	4	6.296	.000
	Brown-Forsythe	119.247	4	4.762	.000
ของเหลวเบส	Welch	21.118	4	7.022	.001
	Brown-Forsythe	19.195	4	9.744	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากของเหลวกรด

Duncan

ความเข้มข้น (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0.4	4	29.857150	
0.6	4	32.178550	
1.0	4		52.964275
0.8	4		54.214300
0.2	4		55.142875
Sig.		.178	.228

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากของเหลวเบส

Duncan

ความเข้มข้น (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1.0	4	.856075			
.8	4	1.106075	1.106075		
.6	4		1.309650	1.309650	
.4	4			1.414100	
.2	4				1.876075
Sig.		.060	.118	.408	1.000

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดซัลฟิวริก 1.0 โมลาร์

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.012167	.0003055	.0001764
	0.2	3	.018533	.0019502	.0011260
	0.3	3	.022467	.0005033	.0002906
	0.4	3	.027967	.0010504	.0006064
	0.5	3	.030133	.0005859	.0003383
	0.6	3	.033533	.0032501	.0018765
	0.7	3	.031400	.0067550	.0039000
	0.8	3	.031567	.0017214	.0009939
	0.9	3	.037500	.0025515	.0014731
	1.0	3	.041433	.0009609	.0005548
	รวม	33	.026064	.0118267	.0020588
12	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.023900	.0174129	.0100534

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
12	0.2	3	.071500	.0075717	.0043715
	0.3	3	.037200	.0039686	.0022913
	0.4	3	.039400	.0176830	.0102093
	0.5	3	.083100	.0381004	.0219973
	0.6	3	.076100	.0066363	.0038314
	0.7	3	.081000	.0189127	.0109192
	0.8	3	.091000	.0132182	.0076315
	0.9	3	.032500	.0096995	.0056000
	1.0	3	.044800	.0034117	.0019698
	รวม	33	.052773	.0313285	.0054536
24	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.040800	.0154793	.0089370
	0.2	3	.039033	.0212050	.0122427
	0.3	3	.098700	.0537628	.0310400
	0.4	3	.102267	.0374253	.0216075
	0.5	3	.067967	.0502340	.0290026
	0.6	3	.059233	.0376151	.0217171
	0.7	3	.079133	.0642126	.0370731
	0.8	3	.135967	.0361243	.0208564
	0.9	3	.220500	.0420000	.0242487
	1.0	3	.231200	.0441829	.0255090
	รวม	33	.097709	.0782804	.0136269
36	0.0	3	.006467	.0099962	.0057713
	0.1	3	.034900	.0216506	.0125000
	0.2	3	.108200	.0704779	.0406904
	0.3	3	.119800	.1128727	.0651671
	0.4	3	.122700	.1145813	.0661535
	0.5	3	.102200	.0605770	.0349741
	0.6	3	.184000	.0256320	.0147986
	0.7	3	.192100	.0039686	.0022913
	0.8	3	.201400	.0056789	.0032787
	0.9	3	.308500	.0017321	.0010000
	1.0	3	.238600	.0263391	.0152069
	รวม	33	.147170	.0979371	.0170487
48	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.015200	.0006000	.0003464
	0.2	3	.019100	.0024249	.0014000
	0.3	3	.027500	.0067506	.0038974
	0.4	3	.068000	.0187446	.0108222
	0.5	3	.063700	.0290215	.0167556
	0.6	3	.080600	.0168116	.0097062
	0.7	3	.072200	.0045033	.0026000
	0.8	3	.111500	.0155885	.0090000
	0.9	3	.131500	.0007550	.0004359
	1.0	3	.151200	.0061992	.0035791
	รวม	33	.067318	.0490854	.0085447

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	2.581	10	22	.031
12	2.110	10	22	.069
24	1.238	10	22	.322
36	6.776	10	22	.000
48	8.263	10	22	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	.004	10	.000	66.005	.000
	Within Groups	.000	22	.000		
	Total	.004	32			
12	Between Groups	.026	10	.003	10.039	.000
	Within Groups	.006	22	.000		
	Total	.031	32			
24	Between Groups	.160	10	.016	9.741	.000
	Within Groups	.036	22	.002		
	Total	.196	32			
36	Between Groups	.234	10	.023	7.056	.000
	Within Groups	.073	22	.003		
	Total	.307	32			
48	Between Groups	.073	10	.007	44.136	.000
	Within Groups	.004	22	.000		
	Total	.077	32			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
0	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
12	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
24	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
36	Welch	323.662	10	8.341	.000
	Brown-Forsythe	7.056	10	7.116	.008
48	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 0 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0	3	.000000						
0.1	3		.012167					
0.2	3			.018533				
0.3	3			.022467				
0.4	3				.027967			
0.5	3				.030133	.030133		
0.7	3				.031400	.031400		
0.8	3				.031567	.031567		
0.6	3					.033533	.033533	
0.9	3						.037500	.037500
1.0	3							.041433
Sig.		1.000	1.000	.073	.128	.150	.071	.073

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 12 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0.0	3	.000000			
0.1	3	.023900	.023900		
0.9	3		.032500		
0.3	3		.037200		
0.4	3		.039400		
1.0	3		.044800	.044800	
0.2	3			.071500	.071500
0.6	3				.076100
0.7	3				.081000
0.5	3				.083100
0.8	3				.091000
Sig.		.081	.165	.053	.194

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
0.2	3	.039033	.039033		
0.1	3	.040800	.040800		
0.6	3	.059233	.059233	.059233	

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง (ต่อ)

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0.5	3	.067967	.067967	.067967	
0.7	3		.079133	.079133	
0.3	3		.098700	.098700	
0.4	3		.102267	.102267	
0.8	3			.135967	
0.9	3				.220500
1.0	3				.231200
Sig.		.077	.107	.051	.749

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 36 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.006467				
0.1	3	.034900	.034900			
0.5	3	.102200	.102200	.102200		
0.2	3	.108200	.108200	.108200		
0.3	3		.119800	.119800		
0.4	3		.122700	.122700		
0.6	3			.184000	.184000	
0.7	3			.192100	.192100	
0.8	3			.201400	.201400	
1.0	3				.238600	.238600
0.9	3					.308500
Sig.		.058	.107	.077	.300	.151

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 48 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000000				
0.1	3	.015200	.015200			
0.2	3	.019100	.019100			
0.3	3		.027500			
0.5	3			.063700		
0.4	3			.068000		
0.7	3			.072200		
0.6	3			.080600		
0.8	3				.111500	
0.9	3				.131500	.131500

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด 1.0 โมลาร์ ที่ 48 ชั่วโมง (ต่อ)

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1.0	3					.151200
Sig.		.099	.282	.155	.071	.075

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.008300	.0017321	.0010000
	0.2	3	.014367	.0015144	.0008743
	0.3	3	.035467	.0002082	.0001202
	0.4	3	.051267	.0074036	.0042745
	0.5	3	.066367	.0067159	.0038774
	0.6	3	.078267	.0036501	.0021074
	0.7	3	.035700	.0007550	.0004359
	0.8	3	.039800	.0005196	.0003000
	0.9	3	.043467	.0029905	.0017266
	1.0	3	.044500	.0003464	.0002000
	รวม	33	.037955	.0230341	.0040097
12	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.032500	.0048000	.0027713
	0.2	3	.061600	.0017578	.0010149
	0.3	3	.031400	.0048775	.0028160
	0.4	3	.066400	.0010392	.0006000
	0.5	3	.107500	.0616610	.0356000
	0.6	3	.088200	.0384062	.0221739
	0.7	3	.148600	.0943146	.0544525
	0.8	3	.094800	.0780625	.0450694
	0.9	3	.164100	.0450583	.0260144
	1.0	3	.124600	.0303850	.0175428
	รวม	33	.083609	.0625420	.0108872
24	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.094700	.0135011	.0077949
	0.2	3	.121400	.0565445	.0326460
	0.3	3	.166400	.0072083	.0041617
	0.4	3	.197600	.0164572	.0095016
	0.5	3	.183700	.0329431	.0190197
	0.6	3	.214300	.1749864	.1010285
	0.7	3	.240400	.0695360	.0401466
	0.8	3	.193300	.0153216	.0088459

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
24	0.9	3	.274100	.0593275	.0342527
	1.0	3	.252600	.0706275	.0407768
	รวม	33	.176227	.0944952	.0164495
36	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.127900	.0094297	.0054443
	0.2	3	.227000	.0153480	.0088612
	0.3	3	.213600	.0666615	.0384870
	0.4	3	.308800	.0979145	.0565310
	0.5	3	.325700	.0262107	.0151327
	0.6	3	.334800	.0453569	.0261868
	0.7	3	.378400	.0301123	.0173853
	0.8	3	.406300	.0210713	.0121655
	0.9	3	.441600	.0136107	.0078581
	1.0	3	.425600	.0234467	.0135370
	รวม	33	.289973	.1366969	.0237959
48	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.194100	.0159009	.0091804
	0.2	3	.316000	.0212075	.0122442
	0.3	3	.324100	.0062450	.0036056
	0.4	3	.443300	.0210178	.0121347
	0.5	3	.390700	.0160390	.0092601
	0.6	3	.464800	.0649519	.0375000
	0.7	3	.430400	.0433013	.0250000
	0.8	3	.506300	.1364011	.0787512
	0.9	3	.709600	.0795424	.0459239
	1.0	3	.532100	.0195192	.0112694
	รวม	33	.391945	.1857628	.0323371

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	3.883	10	22	.004
12	4.639	10	22	.001
24	7.118	10	22	.000
36	5.770	10	22	.000
48	7.344	10	22	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	.017	10	.002	143.162	.000
	Within Groups	.000	22	.000		
	Total	.017	32			
12	Between Groups	.079	10	.008	3.717	.005
	Within Groups	.047	22	.002		
	Total	.125	32			

ตาราง ANOVA (ต่อ)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
24	Between Groups	.188	10	.019	4.216	.002
	Within Groups	.098	22	.004		
	Total	.286	32			
36	Between Groups	.560	10	.056	32.084	.000
	Within Groups	.038	22	.002		
	Total	.598	32			
48	Between Groups	1.039	10	.104	34.779	.000
	Within Groups	.066	22	.003		
	Total	1.104	32			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
0	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
12	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
24	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
36	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
48	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 0 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0	3	.000000							
0.1	3		.008300						
0.2	3			.014367					
0.3	3				.035467				
0.7	3				.035700				
0.8	3				.039800	.039800			
0.9	3					.043467			
1.0	3					.044500			
0.4	3						.051267		
0.5	3							.066367	
0.6	3								.078267
Sig.		1.000	1.000	1.000	.155	.124	1.000	1.000	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 12 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
0.3	3	.031400	.031400		
0.1	3	.032500	.032500		
0.2	3	.061600	.061600	.061600	
0.4	3	.066400	.066400	.066400	
0.6	3		.088200	.088200	.088200
0.8	3		.094800	.094800	.094800
0.5	3		.107500	.107500	.107500
1.0	3			.124600	.124600
0.7	3			.148600	.148600
0.9	3				.164100
Sig.		.126	.089	.053	.086

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
0.1	3	.094700	.094700		
0.2	3		.121400	.121400	
0.3	3		.166400	.166400	.166400
0.5	3		.183700	.183700	.183700
0.8	3		.193300	.193300	.193300
0.4	3		.197600	.197600	.197600
0.6	3		.214300	.214300	.214300
0.7	3			.240400	.240400
1.0	3				.252600
0.9	3				.274100
Sig.		.096	.066	.068	.099

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 36 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.000000					
0.1	3		.127900				
0.3	3			.213600			

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 36 ชั่วโมง (ต่อ)

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0.2	3			.227000			
0.4	3				.308800		
0.5	3				.325700		
0.6	3				.334800	.334800	
0.7	3				.378400	.378400	.378400
0.8	3					.406300	.406300
1.0	3						.425600
0.9	3						.441600
Sig.		1.000	1.000	.698	.073	.059	.102

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส 1.0 โมลาร์ ที่ 48 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.000000					
0.1	3		.194100				
0.2	3			.316000			
0.3	3			.324100			
0.5	3			.390700	.390700		
0.7	3				.430400	.430400	
0.4	3				.443300	.443300	
0.6	3				.464800	.464800	
0.8	3					.506300	
1.0	3					.532100	
0.9	3						.709600
Sig.		1.000	1.000	.127	.141	.051	1.000

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยผงซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.007600	.0007810	.0004509
	0.2	3	.009633	.0015695	.0009062
	0.3	3	.005200	.0007810	.0004509
	0.4	3	.005133	.0004041	.0002333

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
0	0.5	3	.007600	.0004359	.0002517
	0.6	3	.011800	.0006928	.0004000
	0.7	3	.027933	.0003215	.0001856
	0.8	3	.022400	.0062386	.0036019
	0.9	3	.031733	.0020033	.0011566
	1.0	3	.041733	.0080755	.0046624
	รวม	33	.015524	.0131902	.0022961
12	0.0	3	.000200	.0002646	.0001528
	0.1	3	.023033	.0006028	.0003480
	0.2	3	.019100	.0089011	.0051391
	0.3	3	.013233	.0069140	.0039918
	0.4	3	.012333	.0057501	.0033198
	0.5	3	.048567	.0023714	.0013691
	0.6	3	.052333	.0069010	.0039843
	0.7	3	.034700	.0027221	.0015716
	0.8	3	.046067	.0026727	.0015431
	0.9	3	.032233	.0070038	.0040437
	1.0	3	.017967	.0093927	.0054229
	รวม	33	.027252	.0170003	.0029594
24	0.2	3	.026067	.0013279	.0007667
	0.3	3	.046733	.0084299	.0048670
	0.4	3	.040533	.0080835	.0046670
	0.5	3	.046233	.0141154	.0081495
	0.6	3	.058567	.0004726	.0002728
	0.7	3	.046867	.0091227	.0052670
	0.8	3	.053700	.0107429	.0062024
	0.9	3	.047200	.0081664	.0047149
	1.0	3	.079400	.0020421	.0011790
	รวม	33	.042703	.0208323	.0036264
36	0.0	3	.000000	0E-7	0E-7
	0.1	3	.035567	.0031974	.0018460
	0.2	3	.035000	.0030348	.0017521
	0.3	3	.050933	.0021197	.0012238
	0.4	3	.055733	.0073351	.0042349
	0.5	3	.050367	.0040154	.0023183
	0.6	3	.053167	.0015822	.0009135
	0.7	3	.023833	.0026312	.0015191
	0.8	3	.056600	.0033719	.0019468
	0.9	3	.053500	.0006000	.0003464
	1.0	3	.078700	.0090813	.0052431
	รวม	33	.044855	.0202681	.0035282
48	0.0	3	.001233	.0021362	.0012333
	0.1	3	.032733	.0022502	.0012991
	0.2	3	.056200	.0044193	.0025515
	0.3	3	.055633	.0003055	.0001764
	0.4	3	.056933	.0004726	.0002728

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

ชั่วโมง	ปริมาณเอนไซม์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
48	0.5	3	.055900	.0004583	.0002646
	0.6	3	.026767	.0073330	.0042337
	0.7	3	.034167	.0037899	.0021881
	0.8	3	.053533	.0086118	.0049720
	0.9	3	.014000	.0032909	.0019000
	1.0	3	.020100	.0028618	.0016523
	รวม	33	.037018	.0195957	.0034112

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
0	10.237	10	22	.000
12	3.037	10	22	.014
24	4.463	10	22	.002
36	3.511	10	22	.007
48	6.029	10	22	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
0	Between Groups	.005	10	.001	52.108	.000
	Within Groups	.000	22	.000		
	Total	.006	32			
12	Between Groups	.009	10	.001	25.625	.000
	Within Groups	.001	22	.000		
	Total	.009	32			
24	Between Groups	.013	10	.001	22.955	.000
	Within Groups	.001	22	.000		
	Total	.014	32			
36	Between Groups	.013	10	.001	71.023	.000
	Within Groups	.000	22	.000		
	Total	.013	32			
48	Between Groups	.012	10	.001	68.565	.000
	Within Groups	.000	22	.000		
	Total	.012	32			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
0	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
12	Welch	345.223	10	8.262	.000
	Brown-Forsythe	25.625	10	12.015	.000

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย (ต่อ)

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
24	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
36	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
48	Welch	194.431	10	8.541	.000
	Brown-Forsythe	68.565	10	7.922	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 0 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.000000					
0.4	3	.005133	.005133				
0.3	3	.005200	.005200				
0.1	3		.007600	.007600			
0.5	3		.007600	.007600			
0.2	3		.009633	.009633			
0.6	3			.011800			
0.8	3				.022400		
0.7	3					.027933	
0.9	3					.031733	
1.0	3						.041733
Sig.		.072	.136	.155	1.000	.160	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 12 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000200				
0.4	3		.012333			
0.3	3		.013233			
1.0	3		.017967			
0.2	3		.019100			
0.1	3		.023033	.023033		
0.9	3			.032233	.032233	
0.7	3				.034700	
0.8	3					.046067
0.5	3					.048567

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 12 ชั่วโมง (ต่อ)

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.6	3					.052333
Sig.		1.000	.052	.063	.606	.221

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 24 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.0	3	.000000				
0.1	3		.024433			
0.2	3		.026067			
0.4	3			.040533		
0.5	3			.046233	.046233	
0.3	3			.046733	.046733	
0.7	3			.046867	.046867	
0.9	3			.047200	.047200	
0.8	3			.053700	.053700	
0.6	3				.058567	
1.0	3					.079400
Sig.		1.000	.790	.066	.084	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 36 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000000				
0.7	3		.023833			
0.2	3			.035000		
0.1	3			.035567		
0.5	3				.050367	
0.3	3				.050933	
0.6	3				.053167	
0.9	3				.053500	
0.4	3				.055733	
0.8	3				.056600	
1.0	3					.078700
Sig.		1.000	1.000	.871	.124	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น ที่ 48 ชั่วโมง

Duncan

ปริมาณเอนไซม์	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.001233				
0.9	3		.014000			
1.0	3		.020100	.020100		
0.6	3			.026767	.026767	
0.1	3				.032733	
0.7	3				.034167	
0.8	3					.053533
0.3	3					.055633
0.5	3					.055900
0.2	3					.056200
0.4	3					.056933
Sig.		1.000	.087	.063	.050	.381

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วย กรด เบส และน้ำกลั่น โดยเทียบระหว่างการย่อยที่ใช้บัฟเฟอร์ และน้ำประปา

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	ชนิดสาร	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
กรด	บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.008900	.0028868	.0014434
	บัฟเฟอร์ที่ 36 ชั่วโมง	4	.277350	.0008660	.0004330
	น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.011250	.0007506	.0003753
	น้ำประปาที่ 36 ชั่วโมง	4	.259350	.0008660	.0004330
	รวม	16	.139213	.1335450	.0333863
เบส	บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.008750	.0002887	.0001443
	บัฟเฟอร์ที่ 48 ชั่วโมง	4	.698125	.0185893	.0092947
	น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.004500	.0002309	.0001155
	น้ำประปาที่ 48 ชั่วโมง	4	.767025	.1469456	.0734728
	รวม	16	.369600	.3815198	.0953799
น้ำกลั่น	บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.010450	.0024826	.0012413
	บัฟเฟอร์ที่ 24 ชั่วโมง	4	.151400	.0194098	.0097049
	น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.014750	.0007506	.0003753
	น้ำประปาที่ 24 ชั่วโมง	4	.115400	.0136974	.0068487
	รวม	16	.073000	.0646595	.0161649

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
กรด	.	3	.	.
เบส	14.585	3	12	.000
น้ำกลั่น	3.869	3	12	.038

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กรด	Between Groups	.267	3	.089	34303.680	.000
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	.268	15			
เบส	Between Groups	2.118	3	.706	128.694	.000
	Within Groups	.066	12	.005		
	Total	2.183	15			
น้ำกลั่น	Between Groups	.061	3	.020	142.417	.000
	Within Groups	.002	12	.000		
	Total	.063	15			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
กรด	Welch	81260.326	3	6.457	.000
	Brown-Forsythe	34303.680	3	4.575	.000
เบส	Welch	1681.928	3	5.943	.000
	Brown-Forsythe	128.694	3	3.096	.001
น้ำกลั่น	Welch	113.423	3	5.282	.000
	Brown-Forsythe	142.417	3	5.522	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด โดยใช้บัฟเฟอร์ และน้ำประปา

Duncan

ชนิดสาร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.008900		
น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.011250		
น้ำประปาที่ 36 ชั่วโมง	4		.259350	
บัฟเฟอร์ที่ 36 ชั่วโมง	4			.277350
Sig.		.062	1.000	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส โดยใช้บัฟเฟอร์ และน้ำประปา

Duncan

ชนิดสาร	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.004500	
บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.008750	
บัฟเฟอร์ที่ 48 ชั่วโมง	4		.698125
น้ำประปาที่ 48 ชั่วโมง	4		.767025
Sig.		.937	.213

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยน้ำกลั่น โดยใช้บัฟเฟอร์ และน้ำประปา

Duncan

ชนิดสาร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
บัฟเฟอร์ที่ 0 ชั่วโมง	4	.010450		
น้ำประปาที่ 0 ชั่วโมง	4	.014750		
น้ำประปาที่ 24 ชั่วโมง	4		.115400	
บัฟเฟอร์ที่ 24 ชั่วโมง	4			.151400
Sig.		.620	1.000	1.000

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากการย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพกรดที่ 0.2 – 1.0 โมลาร์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง และตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบสเข้มข้น 0.2 – 1.0 โมลาร์ ที่เวลา 36 ชั่วโมง

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	โมลาร์	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
กรด	0.2	4	.363263	.0580237	.0290119
	0.4	4	.547125	.0025617	.0012809
	0.6	4	.424931	.0017321	.0008660
	0.8	4	.421575	.0246893	.0123447
	1.0	4	.424763	.0129904	.0064952
	รวม	20	.436331	.0668255	.0149426
เบส	0.2	4	.353400	.0043301	.0021651
	0.4	4	.389813	.0476314	.0238157
	0.6	4	.298125	.0820248	.0410124
	0.8	4	.416850	.0017321	.0008660
	1.0	4	.636675	.0372391	.0186195
	รวม	20	.418973	.1256202	.0280895

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
กรด	3614.375	4	15	.000
เบส	543.815	4	15	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กรด	Between Groups	.072	4	.018	21.778	.000
	Within Groups	.012	15	.001		
	Total	.085	19			
เบส	Between Groups	.269	4	.067	32.269	.000
	Within Groups	.031	15	.002		
	Total	.300	19			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
กรด	Welch	1215.958	4	6.758	.000
	Brown-Forsythe	21.778	4	4.413	.004
เบส	Welch	171.100	4	6.388	.000
	Brown-Forsythe	32.269	4	6.206	.000

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากกรย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยกรด

Duncan

ความเข้มข้น (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0.2	4	.363263		
0.8	4		.421575	
1.0	4		.424763	
0.6	4		.424931	
0.4	4			.547125
Sig.		1.000	.878	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากกรย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส

Duncan

ความเข้มข้น (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
.6	4	.298125		
.2	4	.353400	.353400	
.4	4		.389813	

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากกรย่อยตัวอย่างที่ปรับสภาพด้วยเบส (ต่อ)

Duncan

ความเข้มข้น (โมลาร์)	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
.6	4	.298125		
.2	4	.353400	.353400	
.4	4		.389813	
.8	4		.416850	
1.0	4			.636675
Sig.		.107	.081	1.000

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0	3	4.651852	1.2934943	.7467993
	12	3	8.007407	8.0181610	4.6292874
	24	3	5.714815	5.9009241	3.4069001
	36	3	10.344444	4.3975723	2.5389395
	48	3	6.674074	3.5251536	2.0352484
	60	3	12.340741	7.8336512	4.5227606
	70	3	12.911111	7.5445917	4.3558721
	84	3	22.955556	7.6466486	4.4147946
	94	3	7.966667	4.6166098	2.6654009
	108	3	4.096296	1.7282094	.9977822
	120	3	6.674074	8.4230162	4.8630307
	รวม	33	9.303367	7.2348877	1.2594323
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	0	3	48.726190	3.8881579	2.2448290
	12	3	52.357129	12.2157406	7.0527611
	24	3	34.095243	1.4039628	.8105783
	36	3	39.226205	6.3629675	3.6736610
	48	3	71.666681	4.8782780	2.8164751
	60	3	42.738090	10.0484293	5.8014633
	70	3	48.952367	3.9084296	2.2565329
	84	3	44.023819	5.3275621	3.0758694
	94	3	63.047629	13.7537420	7.9407267
	108	3	51.988081	4.7577068	2.7468633
	120	3	43.559524	1.8434707	1.0643283
	รวม	33	49.125542	12.0003395	2.0889910
ค่าพีเอช	0	3	5.767	.1528	.0882

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

	ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
ค่าพีเอช	12	3	5.000	.0000	.0000
	24	3	4.500	.0000	.0000
	36	3	4.500	.0000	.0000
	48	3	5.000	.0000	.0000
	60	3	5.000	.0000	.0000
	70	3	4.500	.0000	.0000
	84	3	4.500	.0000	.0000
	94	3	4.500	.0000	.0000
	108	3	4.500	.0000	.0000
	120	3	4.500	.0000	.0000
	รวม	33	4.752	.3962	.0690
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0	3	.183800	.0060233	.0034775
	12	3	.377433	.0626738	.0361847
	24	3	.564200	.0156790	.0090523
	36	3	.670267	.0970589	.0560370
	48	3	.747633	.0337665	.0194951
	60	3	.893133	.0814817	.0470435
	70	3	1.163200	.2650222	.1530107
	84	3	1.294967	.1764866	.1018946
	94	3	1.154133	.1160506	.0670018
	108	3	1.330300	.2454338	.1417013
	120	3	1.126367	.0289638	.0167223
	รวม	33	.864130	.3895289	.0678083
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0	3	3	.280800	.0240774
	12	3	3	.191967	.0216477
	24	3	3	.221367	.0031501
	36	3	3	.175767	.0008386
	48	3	3	.181300	.0155019
	60	3	3	.218067	.0189959
	70	3	3	.270967	.0632658
	84	3	3	.305200	.0200866
	94	3	3	.266300	.0343038
	108	3	3	.311233	.0712121
	120	3	3	2.111533	3.1869448
	รวม	33	33	.412227	.9672280

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	2.432	10	22	.039
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	3.483	10	22	.007
ค่าพีเอช	7.692	10	22	.000
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	2.946	10	22	.017
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	15.712	10	22	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	865.884	10	86.588	2.354	.045
	Within Groups	809.111	22	36.778		
	Total	1674.995	32			
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	3427.406	10	342.741	6.385	.000
	Within Groups	1180.855	22	53.675		
	Total	4608.261	32			
ค่าพีเอช	Between Groups	4.976	10	.498	234.571	.000
	Within Groups	.047	22	.002		
	Total	5.022	32			
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	4.461	10	.446	24.865	.000
	Within Groups	.395	22	.018		
	Total	4.855	32			
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	9.599	10	.960	1.038	.446
	Within Groups	20.338	22	.924		
	Total	29.937	32			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	Welch	1.721	10	8.580	.219
	Brown-Forsythe	2.354	10	15.016	.065
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	Welch	14.640	10	8.606	.000
	Brown-Forsythe	6.385	10	9.650	.004
ค่าพีเอช	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	Welch	317.048	10	8.282	.000
	Brown-Forsythe	24.865	10	7.896	.000
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Welch	46.564	10	8.114	.000
	Brown-Forsythe	1.038	10	2.005	.585

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

น้ำหนักเซลล์แห้ง

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
108	3	4.096296	
0	3	4.651852	
24	3	5.714815	
48	3	6.674074	
120	3	6.674074	
94	3	7.966667	
12	3	8.007407	
36	3	10.344444	
60	3	12.340741	12.340741
70	3	12.911111	12.911111
84	3		22.955556
Sig.		.139	.053

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
24	3	34.095243			
36	3	39.226205	39.226205		
60	3	42.738090	42.738090		
120	3	43.559524	43.559524		
84	3	44.023819	44.023819		
0	3		48.726190		
70	3		48.952367		
108	3		51.988081	51.988081	
12	3		52.357129	52.357129	
94	3			63.047629	63.047629
48	3				71.666681
Sig.		.150	.068	.093	.164

ค่าพีเอช

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
24	3	4.500		
36	3	4.500		
70	3	4.500		
84	3	4.500		
94	3	4.500		

ค่าพีเอช (ต่อ)

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
108	3	4.500		
120	3	4.500		
12	3		5.000	
48	3		5.000	
60	3		5.000	
0	3			5.767
Sig.		1.000	1.000	1.000

กรดอะซิติก

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.183800				
12	3	.377433	.377433			
24	3		.564200	.564200		
36	3			.670267	.670267	
48	3			.747633	.747633	
60	3				.893133	
120	3					1.126367
94	3					1.154133
70	3					1.163200
84	3					1.294967
108	3					1.330300
Sig.		.090	.102	.126	.066	.107

เอทานอล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
36	3	.175767	
48	3	.181300	
12	3	.191967	
60	3	.218067	
24	3	.221367	
94	3	.266300	
70	3	.270967	
0	3	.280800	

เอทานอล (ต่อ)

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
84	3	.305200	
108	3	.311233	
120	3		2.111533
Sig.		.882	1.000

ตารางที่ ข.8 การวิเคราะห์ทางสถิติการเจริญของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* DSM 792 ในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งน้ำตาลเป็นสารที่ได้จากการปรับสภาพและย่อย โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

	ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	0	3	.277778	.0222222	.0128300
	12	3	.307407	.1785861	.1031067
	22	3	4.607367	1.5436918	.8912509
	36	3	.314815	.0420660	.0242868
	46	3	.659259	.5655035	.3264936
	60	3	.696296	.6864952	.3963482
	72	3	1.696296	2.3134159	1.3356513
	84	3	1.525926	1.5941766	.9203983
	96	3	.248148	.1796201	.1037037
	108	3	.288889	.2003084	.1156481
	120	3	.181481	.0357172	.0206213
	รวม	33	1.036027	2.1306896	.3709055
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	0	3	63.035733	2.4371923	1.4071136
	12	3	61.178600	3.7489931	2.1644822
	22	3	44.464300	8.8504122	5.1097879
	36	3	43.666662	10.1685580	5.8708197
	46	3	38.571429	4.5988297	2.6551356
	60	3	44.154762	.6271222	.3620692
	72	3	48.476190	1.2385101	.7150542
	84	3	43.964286	1.6475089	.9511897
	96	3	51.946429	.9831164	.5676025
	108	3	48.077381	.7170334	.4139794
	120	3	46.595238	.6085418	.3513418
	รวม	33	48.557365	8.2059756	1.4284770
ค่าพีเอช	0	3	5.000	.0000	.0000
	12	3	5.000	.0000	.0000
	22	3	5.000	.0000	.0000

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

	ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
ค่าพีเอช	36	3	5.000	.0000	.0000
	46	3	5.000	.0000	.0000
	60	3	5.000	.0000	.0000
	72	3	5.000	.0000	.0000
	84	3	5.000	.0000	.0000
	96	3	4.900	.1000	.0577
	108	3	4.767	.0577	.0333
	120	3	4.600	.1000	.0577
	รวม	33	4.933	.1339	.0233
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0	3	16.109900	3.3189281	1.9161840
	12	3	16.955867	2.3458267	1.3543637
	22	3	12.763100	3.9154480	2.2605849
	36	3	10.166967	2.6304247	1.5186764
	46	3	14.742400	3.9657558	2.2896302
	60	3	11.738533	.9551668	.5514658
	72	3	9.972333	1.5456653	.8923903
	84	3	12.012367	3.2263551	1.8627370
	84	3	12.012367	3.2263551	1.8627370
	96	3	10.716933	5.7331001	3.3100069
	108	3	14.227800	2.2813149	1.3171177
	120	3	12.026567	.4017893	.2319732
	รวม	33	12.857524	3.4447839	.5996599
กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	0	3	22.491800	3.2173783	1.8575542
	12	3	27.624533	2.1362751	1.2333790
	22	3	22.965500	4.6587995	2.6897592
	36	3	17.718067	4.1969164	2.4230908
	46	3	22.876100	4.0719670	2.3509513
	60	3	18.638300	1.8711077	1.0802845
	72	3	17.660433	1.8191999	1.0503156
	84	3	20.861867	3.0725495	1.7739373
	96	3	16.584600	6.9096847	3.9893083
	108	3	22.719800	2.7475854	1.5863191
	120	3	21.774167	.1987192	.1147306
	รวม	33	21.083197	4.3184430	.7517444
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0	3	1.648033	.5430660	.3135393
	12	3	2.434633	.3918976	.2262622
	22	3	2.505467	1.0784832	.6226626
	36	3	4.436400	4.6465493	2.6826865
	46	3	3.050733	1.2311744	.7108189

ตารางค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ต่อ)

	ชั่วโมง	N	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	60	3	1.622733	.8003606	.4620884
	72	3	.886067	.2167774	.1251565
	84	3	1.401567	.9367790	.5408496
	96	3	2.314467	1.4714182	.8495237
	108	3	3.281733	.7899368	.4560702
	120	3	1.167267	.3698382	.2135262
	รวม	33	2.249918	1.6929174	.2946991
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	0	3	.000000	0E-7	0E-7
	12	3	.000000	0E-7	0E-7
	22	3	.517600	.0050478	.0029143
	36	3	.347467	.0783005	.0452068
	46	3	.998433	.0766291	.0442418
	60	3	.991133	.2072094	.1196324
	72	3	1.195400	.0827799	.0477930
	84	3	1.475900	.0183524	.0105958
	96	3	1.063933	.7556223	.4362588
	108	3	2.331033	.0923928	.0533430
	120	3	.874300	.0862535	.0497985
	รวม	33	.890473	.6857178	.1193681

ตารางทดสอบเอกพันธ์ของความแปรปรวน

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	8.573	10	22	.000
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	6.564	10	22	.000
ค่าพีเอช	3.747	10	22	.005
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	1.965	10	22	.090
กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	2.225	10	22	.057
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	6.425	10	22	.000
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	12.201	10	22	.000

ตาราง ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	51.573	10	5.157	5.076	.001
	Within Groups	22.350	22	1.016		
	Total	73.924	32			
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	1696.085	10	169.609	8.134	.000
	Within Groups	458.732	22	20.851		
	Total	2154.817	32			

ตาราง ANOVA (ต่อ)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ค่าพีเอช	Between Groups	.527	10	.053	24.829	.000
	Within Groups	.047	22	.002		
	Total	.573	32			
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	166.848	10	16.685	1.724	.138
	Within Groups	212.881	22	9.676		
	Total	379.729	32			
กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	311.970	10	31.197	2.410	.041
	Within Groups	284.796	22	12.945		
	Total	596.766	32			
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	33.293	10	3.329	1.254	.313
	Within Groups	58.418	22	2.655		
	Total	91.711	32			
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	Between Groups	13.748	10	1.375	23.299	.000
	Within Groups	1.298	22	.059		
	Total	15.047	32			

ตารางการทดสอบการเท่ากันของค่าเฉลี่ย

		Statistic[a]	df1	df2	Sig.
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	Welch	3.002	10	8.494	.061
	Brown-Forsythe	5.076	10	6.076	.029
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	Welch	20.254	10	8.686	.000
	Brown-Forsythe	8.134	10	6.006	.009
ค่าพีเอช	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	Welch	1.705	10	8.384	.225
	Brown-Forsythe	1.724	10	11.899	.185
กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	Welch	2.974	10	8.078	.067
	Brown-Forsythe	2.410	10	11.163	.081
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	Welch	3.995	10	8.618	.027
	Brown-Forsythe	1.254	10	3.583	.458
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	Welch	.	.	.	.
	Brown-Forsythe	.	.	.	.

ตารางแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของชุดข้อมูล

น้ำหนักเซลล์แห้ง

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
120	3	.181481	

น้ำหนักเซลล์แห้ง (ต่อ)

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
96	3	.248148	
0	3	.277778	
108	3	.288889	
12	3	.307407	
36	3	.314815	
46	3	.659259	
60	3	.696296	
84	3	1.525926	
72	3	1.696296	
22	3		4.607367
Sig.		.127	1.000

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
46	3	38.571429		
36	3	43.666662	43.666662	
84	3	43.964286	43.964286	
60	3	44.154762	44.154762	
22	3	44.464300	44.464300	
120	3	46.595238	46.595238	
108	3		48.077381	
72	3		48.476190	
96	3		51.946429	
12	3			61.178600
0	3			63.035733
Sig.		.068	.065	.623

ค่าพีเอช

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
120	3	4.600			
108	3		4.767		
96	3			4.900	
0	3				5.000

ค่าพีเอช (ต่อ)

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12	3				5.000
22	3				5.000
36	3				5.000
46	3				5.000
60	3				5.000
72	3				5.000
84	3				5.000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

กรดอะซิติก

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
72	3	9.972333		
36	3	10.166967	10.166967	
96	3	10.716933	10.716933	
60	3	11.738533	11.738533	11.738533
84	3	12.012367	12.012367	12.012367
120	3	12.026567	12.026567	12.026567
22	3	12.763100	12.763100	12.763100
108	3	14.227800	14.227800	14.227800
46	3	14.742400	14.742400	14.742400
0	3		16.109900	16.109900
12	3			16.955867
Sig.		.118	.055	.087

กรดแลคติก

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
96	3	16.584600	
72	3	17.660433	
36	3	17.718067	
60	3	18.638300	
84	3	20.861867	20.861867
120	3	21.774167	21.774167
0	3	22.491800	22.491800
108	3	22.719800	22.719800
46	3	22.876100	22.876100

กรดแลคติก (ต่อ)

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
22	3	22.965500	22.965500
12	3		27.624533
Sig.		.074	.055

เอทานอล

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
72	3	.886067	
120	3	1.167267	
84	3	1.401567	1.401567
60	3	1.622733	1.622733
0	3	1.648033	1.648033
96	3	2.314467	2.314467
12	3	2.434633	2.434633
22	3	2.505467	2.505467
46	3	3.050733	3.050733
108	3	3.281733	3.281733
36	3		4.436400
Sig.		.135	.061

อะซีโตน

Duncan

ชั่วโมง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	3	.000000					
12	3	.000000					
36	3	.347467	.347467				
22	3		.517600	.517600			
120	3			.874300	.874300		
60	3				.991133		
46	3				.998433		
96	3				1.063933	1.063933	
72	3				1.195400	1.195400	
84	3					1.475900	
108	3						2.331033
Sig.		.111	.400	.086	.160	.061	1.000