บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. เนื้อลำไยแห้งอายุ 2 ปี (นางโสภิต บุญก้ำ บ้านเลขที่ 53 หมู่ 7 ตำบลมะขามหลวง อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่) และลำไยสดแช่แข็งอายุ 2 ปี
2. เชื้อจุลินทรีย์ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, Thailand Insti-tute of Scientific and Technology Research, TISTR) จำนวน 5 สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* และ *Klebsiella* sp. ดังแสดงในตาราง 3.1 ทำการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่และเก็บในรูปกลีเซอรอลสต็อก (glycerol stock) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตาราง 3.1 จุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง

Strain	TISTR Number
S. cerevisiae	5020, 5339, 5606
C. utilis	5001, 5032, 5043, 5046, 5198, 5352
E. coli	361, 1261
Z. mobilis	405, 548, 550
Klebsiella sp.	1383

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2 สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4, LabScan, Code. No. A8302, Dublin, Ireland)
2. กรดซิตริก (citric acid, $C_6H_8O_7$, Cat. No. A160, Ajax FineChem, Wellington, New Zealand)
3. กรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid, CCl_3COOH, Sigma, Cat. No. T4396, St. Louis, United States of America)

4. กรดเบนโซอิก (benzoic acid, $C_7H_6O_2$, Ajax FineChem, Cat. No. A926, Seven Hills, Australia)
5. กรดแอซีติกไร้น้ำ (glacial acetic acid, CH_3COOH, Labscan, Cat. No. A8401, Dublin, Ireland)
6. กลูโคส (*D* - glucose, $C_6H_{12}O_6$, Ajax, Cat. No. A783, Wellington, New Zealand)
7. ซูโครส (sucrose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, Ajax, Cat. No. A530, Auckland, New Zealand)
8. โซเดียมไพรูเวต (sodium pyruvate, $C_3H_3NaO_3$, Fluka, Cat. No. 15990, Steinheim, Germany)
9. ไตรเอทาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์ (triethanolamine hydrochloride, $C_6H_{15}NO_3.HCl$, Sigma, Cat. No. T1502, St. Louis, United States of America)
10. ไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate, TPP, $C_{12}H_{19}N_4O_7P_2S$, Sigma, Cat. No. C8754, St. Louis, United States of America)
11. เนื้อสกัด (beef extract, Hardy Diagnostics, Cat. No. C5101, California, United States of America)
12. น้ำกลั่น (H_2O, บริษัทเชียงใหม่โพลสตาร์จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย)
13. ไนโตรเจนเหลว (ลานนาเกษตรอินดัสเตรียลแก๊ส อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย)
14. เบนซาลดีไฮด์ (benzaldehyde, C_7H_6O, POCH, Cat. No. 161530427, Sowinskiego, Poland)
15. เปปโตน (peptone, Hardy Diagnostics, Cat. No. C7481, California, USA)
16. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide, KOH, Ajax, Cat. No. A405, Wellington, New Zealand)
17. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, Ajax, Cat. No. A391, Seven Hills, Australia)
18. ฟรุกโตส (*D* - fructose, $C_6H_{12}O_6$, Ajax, Cat. No. A775, Seven Hills, Australia)
19. มอลต์สกัด (malt extract, Becton, Ref. No. 218630, Dickson and company, Le Pont de Claix, France)
20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปต้าไฮเดรต (magnesium sulphate heptahydrate, $MgSO_4.7H_2O$, Ajax, Cat. No. A302, Seven Hills, Australia)
21. ยีสต์สกัด (yeast extract, Hardy Diagnostics, Cat. No. C7341, California, United States of America)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

22. สารต้านการเกิดฟองในอาหารเลี้ยงเชื้อ (antifoam, dipropylene glycol, $C_6H_{14}O_3$, Fluka, Cat. No. 43560, Steinheim, Germany)
23. สารละลายมาตรฐาน ระดับความเป็นกรดด่าง 10 (Ajax, Cat. No. A2564, Seven Hills, Australia)
24. สารละลายมาตรฐาน ระดับความเป็นกรดด่าง 4 (Ajax, Cat. No. A2490, Seven Hills, Australia)
25. สารละลายมาตรฐาน ระดับความเป็นกรดด่าง 7 (Ajax, Cat. No. A2491, Seven Hills, Australia)
26. ออกทานอล (1-octanol, $C_8H_{18}O$, Panreac, Cat. No. 163386, Barcelona, Spain)
27. เอทานอล (ethanol, C_2H_5OH, Merk, Prod. No. 1.00983, Darmstadt, Germany)
28. แอซีโตไนไตรล์ (acetonitrile, CH_3CN, Merck, Cat. No. 1.14291.400, Darmstadt, Germany)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัด

1. ภาชนะต้มและนึ่งทำจากอะลูมิเนียม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 36 - 40 เซนติเมตร ความสูง 9 - 14 เซนติเมตร
2. เตาแก๊สหุงต้ม (LF-402, Lucky Flame, Samutprakarn, Thailand)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, Model No. ARC 120, New Jersey, USA)
4. ขวดแก้วขนาด 550 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 7.5 × 12.7 เซนติเมตร^2)
5. ผ้าขาวบาง
6. กรวย
7. ขวดพลาสติกโพลีเอทิลีนขนาด 100 มิลลิลิตร

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. ขวดเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 5.0 × 7.5 เซนติเมตร^2)
2. ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กปริมาตร 550 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 7.5 × 12.7 เซนติเมตร^2)
3. ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลาง × สูง = 2.6 × 5.9 เซนติเมตร^2)
5. ท่อซิลิโคน (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน × เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก = 3 × 5 และ 7 × 11 มิลลิเมตร^2 (Dura, Code No.: EZ-TG101 (3 × 5 มิลลิเมตร^2), Code No.: EZ-TG108 (7 × 11 มิลลิเมตร^2))
6. ปั๊มลม (Bigboy 6000, China)
7. จุกยาง เบอร์ 13 (โอวี เคมิเคิล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย)
8. ซิลิโคน ซีลแลนท์ (Dow Corning®, Jincheon, Korea)
9. ถังความดันฆ่าเชื้อแบบเคลื่อนย้ายได้ (portable pressure sterilizer, All Amer-ican, Model No. 1925x, Wisconsin, United States of America)
10. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (Accuplus, Model i250, Bangkok, Thailand)
11. ตู้ดูดควัน (fume cupboard, Toplab, Thailand)

3.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus, Model No. ARC 120, New Jersey, United States of America)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Ohaus, Model No. AR2140, New Jersey , United States of America)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร (MiniSpin, Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร (Nuve, Model No. NF200, Angara, Turkey)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร (Sorvall, Model No. Super T21, Massachusetts, United States of America)
6. เครื่องวัดค่าดัชนีหักเหของแสง (Atago, Model No. N-1α, Brix 0 - 32%, Tokyo, Japan)
7. เครื่องวัดระดับความเป็นกรดด่าง (pH meter, Eutech Instruments, Model pH 510, Nijkirk, Japan)
8. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงแบบ double - beam (PerkinElmer Instruments, Model No. Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, Shelton, United States of America)
9. เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, 1200 Series Agilent Technologies)
   - Autosampler (Prod. No. G1313A)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Column Thermostat (Prod. No. G1316A)
- Diode Array Detector (Prod. No. G1315D 1200 Series)
- Refractive Index Detector (Prod. No. G1362A)

10. คอลัมน์โครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง อนุภาคขนาด 9 ไมโครเมตร ความยาว × เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน = 300 × 7.8 มิลลิเมตร^2 (Aminex® HPX-87H ion exclusion, BioRad, Hercules, California, United States of America)
11. คอลัมน์โครมาโตกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง อนุภาคขนาด 5 ไมโครเมตร ความยาว × เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน = 150 × 4.6 มิลลิเมตร^2 (Altima™ C8, Alltech, Lexington, Kentucky, United States of America)
12. ไนลอนเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (Ultiporn 66™ NR047100, NY, United States of America)
13. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer, LMS, Model VTX-3000L, Tokyo, Japan)
14. ตู้บ่มแบบเขย่า (orbital shaking incubator, n-Biotek, Model No. NB-205, GyeongGi-Do, Korea)
15. ลูกปัดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.55 มิลลิเมตร (glass bead, Sigma, Cat. No. G8772, St. Louis, United States of America)
16. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer, Model No. MGS-1001, Tokyo, Japan)
17. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Model No. 400, Oxford, United Kingdom)
18. คิวเว็ตขนาด 1.5 มิลลิลิตร (cuvette, PlastiBrand, Cat. No. 759015, Wertheim, Germany)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเตรียมแหล่งอาหารคาร์บอน และแหล่งอาหารไนโตรเจน สำหรับเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแยกจากกัน เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ที่เป็นการทำปฏิกิริยากันของน้ำตาลรีดิวซิ่งกับกรดอะมิโนแล้วให้สารสีน้ำตาล (มณฑล, 2552) นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที ด้วยถังความดันฆ่าเชื้อแบบเคลื่อนย้ายได้ หลังจากอุณหภูมิแหล่งอาหารทั้งสองชนิดลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้องจึงนำมาผสมกันภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

3.3.1 Nutrient broth

อาหาร nutrient broth สำหรับ *E. coli* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Klebsiella* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เนื้อสกัด 3.0 กรัม และเปปโตน 5.0 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 Yeast medium

อาหาร Yeast medium สำหรับ *C. utilis* จำนวน 6 สายพันธุ์ และ *S. cerevisiae* จำนวนรวม 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย กลูโคส 10.0 กรัม ยีสต์สกัด 3.0 กรัม มอลต์สกัด 5.0 กรัม และเปปโตน 5.0 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

3.3.3 *Zymomonas* medium

อาหาร Zymomonas medium สำหรับ *Z. mobilis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย กลูโคส 20.0 กรัม ยีสต์สกัด 10.0 กรัม และเปปโตน 10.0 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

ใช้ปิเปตแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงระดับ 100 มิลลิลิตรในการทดลองขั้นตอนที่ 3.4.2 หรือ 15 มิลลิลิตร สำหรับการเพาะเลี้ยงระดับ 150 มิลลิลิตร ในการทดลองขั้นตอนที่ 3.4.3 ใส่ลงในขวดเลี้ยงกล้าเชื้อภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.4 สารสกัดลำไยอบแห้ง

ต้มเนื้อลำไยและน้ำกลั่นในอัตราส่วนมวลเนื้อลำไย 30 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มต่ออีก 30 นาที รอให้อุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง ทำการกรองผ่านผ้าขาวบางที่วางซ้อนบนตะแกรงซึ่งมีรูพรุนขนาด 0.5 มิลลิเมตร และ 1 มิลลิเมตร ตามลำดับ นำของเหลวที่กรองได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.5 สารสกัดลำไยสด

ต้มน้ำกลั่น 20 ลิตร จนเดือด ก่อนเติมเนื้อลำไยสดน้ำหนัก 20 กิโลกรัม จนสารสกัดน้ำลำไยที่มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดประมาณ 17 - 18 องศาบริกซ์ ซึ่งเป็นระดับที่สอดคล้องกับสารสกัดลำไยอบแห้งจากขั้นตอน 3.3.4 แล้วรอให้อุณหภูมิลดลงจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง กรองผ่านผ้าขาวบางที่วางซ้อนบนตะแกรงซึ่งมีรูพรุนขนาด 0.5 มิลลิเมตร และ 1 มิลลิเมตร ตามลำดับ นำของเหลวที่กรองได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.3.6 แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น

เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลในสารสกัดลำไยมีมากกว่าในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อในขั้นตอน 3.4.2 และ 3.4.3 จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นแหล่งอาหารไนโตรเจนให้เพียงพอกับปริมาณน้ำตาลในสารสกัดลำไยทั้งสองชนิด เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงไม่เกิดสภาพขาดแหล่งอาหารไนโตรเจนในการสร้างมวลชีวภาพ จึงทำการเตรียมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นสำหรับกรณีใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นสารสกัดลำไยสดและลำไยอบแห้ง ในการเพาะเลี้ยงระดับ 100, 150 และ 1,500 มิลลิลิตร ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.6.1 แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น nutrient broth ประกอบด้วย เนื้อสกัด 75 กรัม และเปปโตน 125 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

3.3.6.2 แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น yeast medium ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 75 กรัม มอลต์สกัด 125 กรัม และ เปปโตน 125 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

3.3.6.3 แหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้น *Zymomonas* medium ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 250 กรัม และ เปปโตน 250 กรัม ต่อปริมาตร 1 ลิตร

3.4 วิธีการทดลอง

มีทั้งหมด 4 ขั้นตอนการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.4.1 ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำตาลและโปรตีน และอัตราส่วนเนื้อลำไยอบแห้งกับน้ำที่เหมาะสม

ออกแบบและทำการทดลองแบบ factorial design ขนาด 5 × 6 = 30 การทดลอง สำหรับวิธีการสกัด 5 วิธี ได้แก่

ก. ทำการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง หรือ “แช่” เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (S24)

ข. ทำการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องแล้วสกัดต่อด้วยน้ำเดือด หรือ “แช่แล้วต้ม” อีก 30 นาที (S24B30)

ค. ทำการสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที (B30)

ง. ผสมมวลเนื้อลำไยอบแห้งกับน้ำกลั่น แล้วสกัดด้วยไอน้ำเดือด หรือ “นึ่ง” 30 นาที (ST30)

จ. ทำการสกัดด้วยน้ำเดือด 30 นาที จำนวน 2 ครั้ง (B30x2)

ชั่งมวลเนื้อลำไย 6 ระดับ (10, 30, 50, 70, 100 และ 130 กรัม) แล้วผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 550 มิลลิลิตร สำหรับการสกัดด้วยน้ำเดือด จำนวน 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดครั้งแรก กรองผ่านผ้าขาวบาง ก่อนนำไปสกัดต่อกับลำไยอบแห้งชุดใหม่ที่มีมวลเท่าเดิม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำของเหลวที่สกัดได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,822×g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อขจัดตะกอนก่อนดำเนินการวิเคราะห์

วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส โดยวิธีโครมาโตรกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H (วรายุทธและนพพล 2551; NREL, 1998; Graves *et al.*, 2006) วัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายน้ำด้วย Coomassie blue reagent

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(BioRad) ตามวิธีของ Bradford (1976) และความเข้มข้นของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ในหน่วยองศาบริกซ์ ด้วยเครื่องวัดค่าดัชนีการหักเหของแสง

ให้คะแนนประสิทธิภาพการสกัดในแต่ละการทดลอง โดยแบ่งเป็นสามส่วนดังต่อไปนี้

- ส่วนที่หนึ่ง - คะแนนเต็ม 33.34 คะแนน คิดสัดส่วนคะแนนเทียบกับการทดลองที่สกัดได้ความเข้มข้นรวมของน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส ในระดับสูงที่สุด
- ส่วนที่สอง - คะแนนเต็ม 33.33 คะแนน คิดสัดส่วนคะแนนเทียบกับการทดลองที่สามารถสกัดร้อยละมวลรวมน้ำตาลต่อมวลเนื้อลำไยอบแห้ง ได้ระดับสูงที่สุด
- ส่วนที่สาม - คะแนนเต็ม 33.33 คะแนน คำนวณจากปริมาตรสารสกัดลำไยอบแห้งที่ได้ หากปริมาตรที่สกัดได้มีค่ามากกว่า 50 มิลลิลิตร ได้คะแนนเต็ม ส่วนปริมาตรที่น้อยกว่านั้น ให้คิดเป็นสัดส่วนคะแนนเทียบกับปริมาตร 50 มิลลิลิตร

คำนวณคะแนนประสิทธิภาพการสกัดสัมพัทธ์ต่อค่าใช้จ่ายและเวลาสกัด คิดจากค่าใช้ จ่ายและเวลาที่ใช้ในการสกัดในแต่ละการทดลอง แล้วเทียบร้อยละกับการทดลองที่มีคะแนนประสิทธิภาพการสกัดสัมพัทธ์สูงที่สุด

ทำการคำนวณค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิธีรวมค่าคลาดเคลื่อน ตลอดจนการตรวจสอบสมมติฐานทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ตามวิธีของ Skoog และคณะ (1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม ในการผลิตเอทานอลโดยใช้สารสกัดลำไยสดเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ในสภาวะที่มีการเติมอากาศ

3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อจุลินทรีย์ระดับ 10 มิลลิลิตร

เติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งไว้ที่อุณหภูมิ 25.6 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยตลอด 17 ปี ของจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2531 - 2548 (E – Chiang Mai, 2007) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

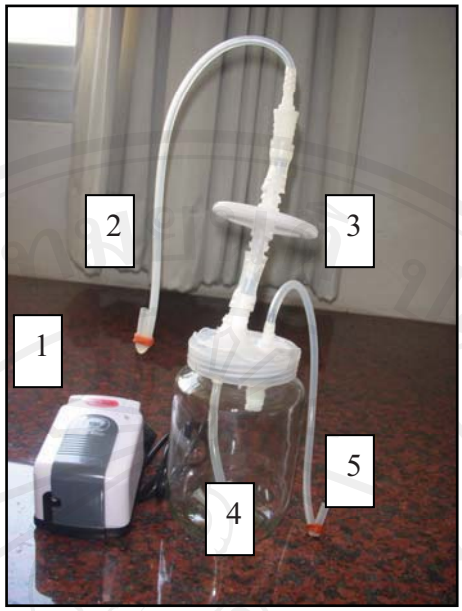
3.4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ระดับ 100 มิลลิลิตร

นำสารสกัดลำไยสดแช่แข็งที่ไม่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารสกัดลำไยสดปริมาตร 94 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นปริมาตร 6 มิลลิลิตร รวมปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็กที่ผ่านการดัดแปลงให้มีการเติมอากาศได้ (ภาพ 3.1) ซึ่งเติมสารต้านการเกิดฟองปริมาตร 4 หยด และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาละลายที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 25.6 องศาเซลเซียส กระทั่งอุณหภูมิเข้าสู่สภาวะสมดุล ก่อนเติมกล้าเชื้อจากการเพาะเลี้ยงระดับ 10 มิลลิลิตร ในขั้นตอน 3.4.2.1 ลงไป แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น ทำการหมักแบบเติมอากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหมักแบบตั้งนิ่งโดยไม่มีการเติมอากาศต่ออีก 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับ 1,500 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (จำนวนจุลินทรีย์ × การเติมแหล่งไนโตรเจน 2 แบบ (เติมและไม่เติม) × จำนวนขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ซ้ำ × ตัวอย่าง 4 ซ้ำ จากแต่ละขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ: 15 × 2 × 2 × 4 = 240 ตัวอย่าง)

3.4.2.3 การเก็บตัวอย่าง

ก่อนการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 48 ชั่วโมง ทำการแกว่งขวดเพาะเลี้ยงเชื้อในแนวระดับจำนวน 10 รอบ เพื่อให้ของเหลวและตะกอนผสมกันดี แล้วใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร โดยสองหลอดผ่านการชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าขณะที่ไม่มีฝา แช่แข็งตัวอย่างอย่างฉับพลันด้วยไนโตร-เจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ก่อนเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส ดังแสดงในภาพ 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

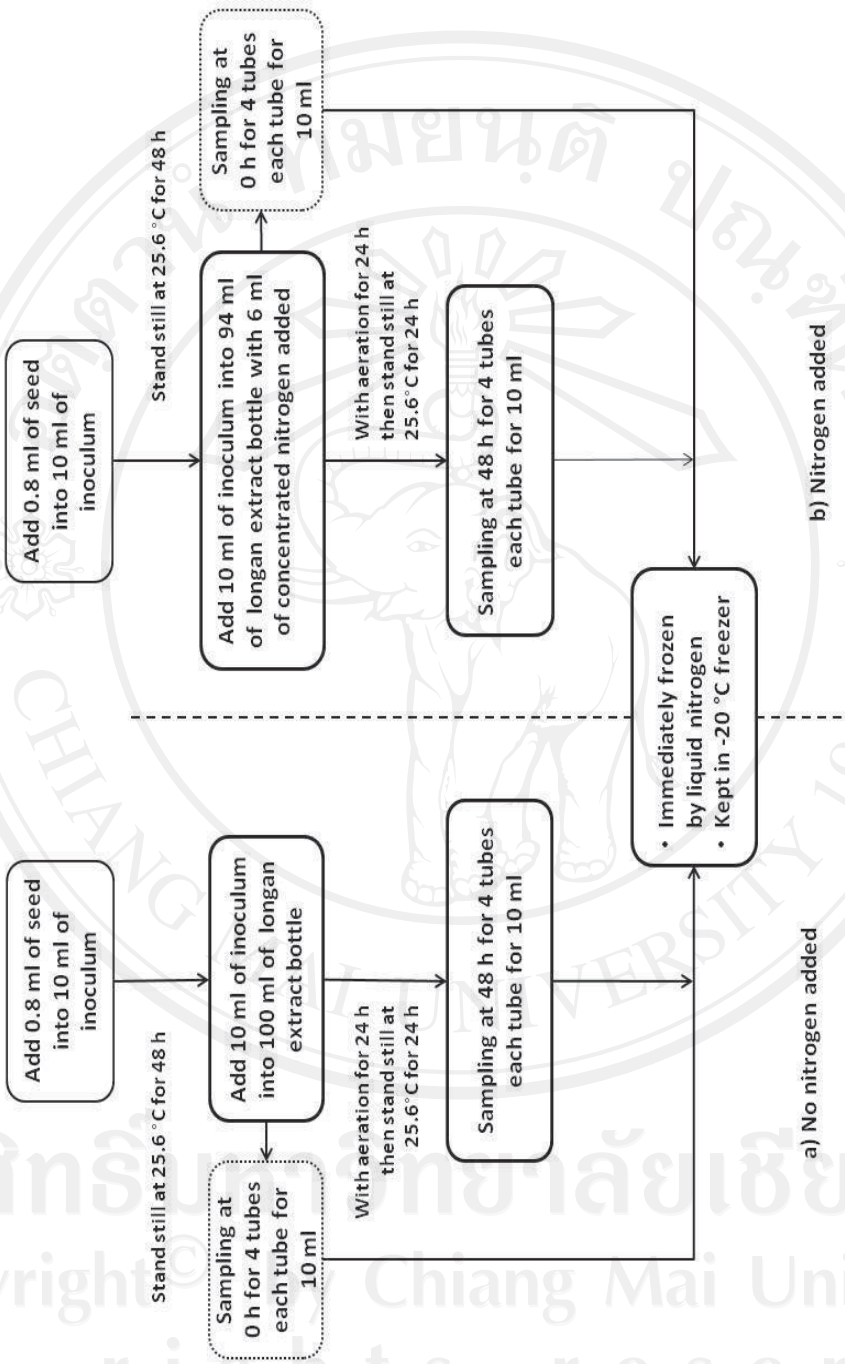


ภาพ 3.1 ชุดเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ระดับ 100 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วย 1) ปั๊มลม 2) ท่ออากาศเข้า 3) ชุดกรองอากาศ (air filtration unit) ทำจาก polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร 4) ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก 5) ท่อก๊าซออก

3.4.2.4 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

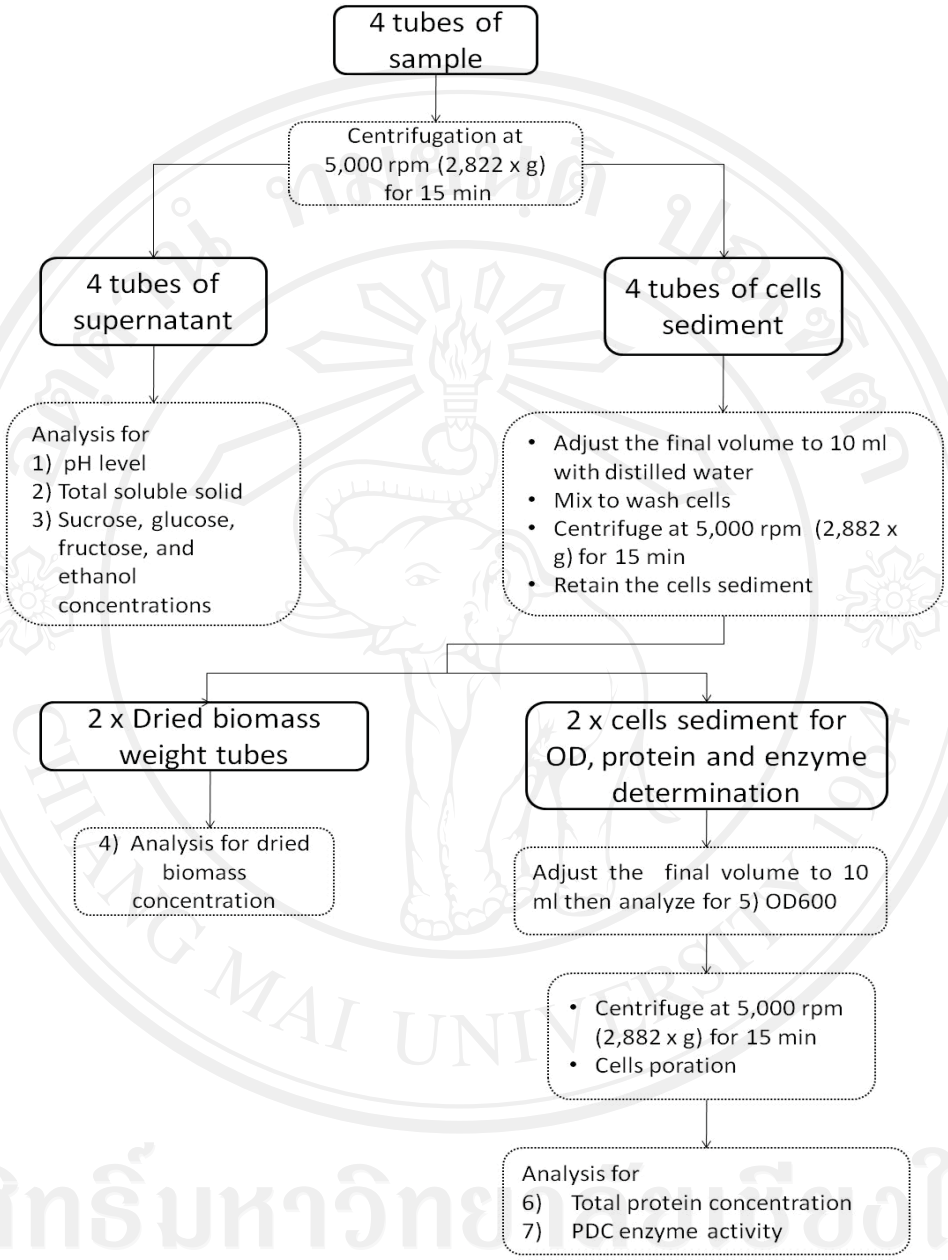
ทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ตามภาพ 3.3 โดยนำหลอดหมุนเหวี่ยงที่บรรจุตัวอย่างแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที (2,822xg) เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนตะกอนเซลล์และส่วนของเหลวใส นำของเหลวใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และความเข้มข้นเอทานอล (ภาคผนวก ฏ) ค่าระดับความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ในของเหลว ค่ามวลชีวภาพแห้ง (ภาคผนวก ช) ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้จะนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ก่อนการวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง(ภาคผนวก ซ) รวมทั้งค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase, PDC) ด้วยวิธีคาร์โบไลเกส (carboligase) (ภาคผนวก ฎ) และความเข้มข้นโปรตีน (ภาคผนวก ญ) หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดรูรั่วแล้ว (ภาคผนวก ฌ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.2 การเก็บตัวอย่างในการทดสอบผลกระทบของการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ 15 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างสำหรับการทดลอง 3.4.2

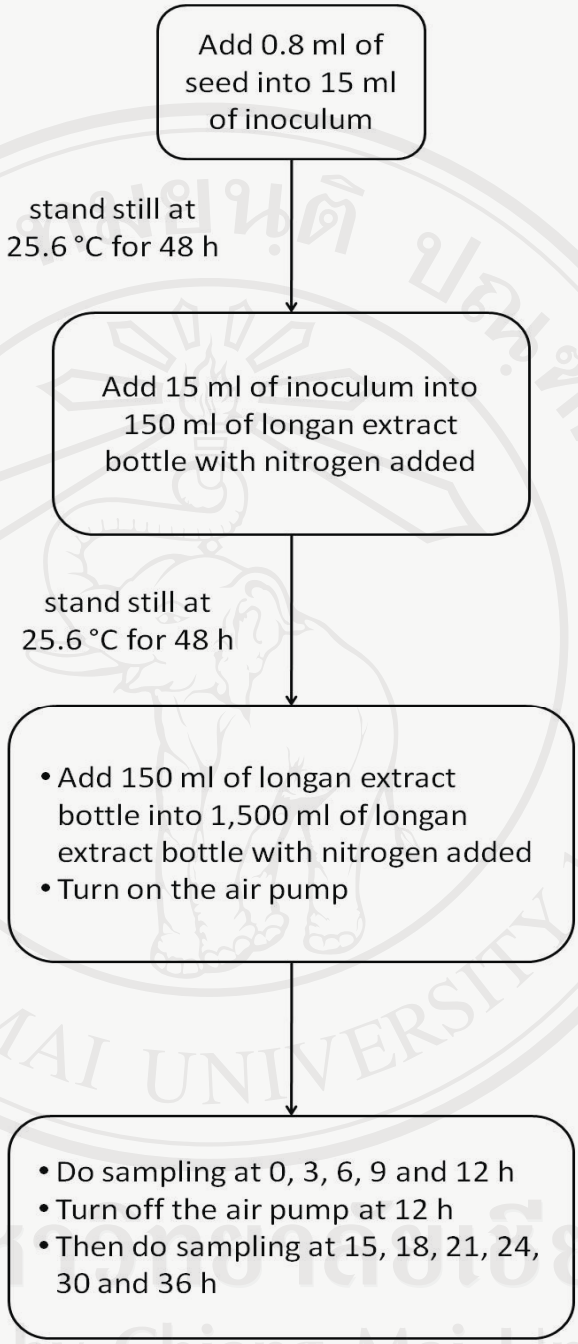
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ *S. cerevisiae* TISTR 5020 ในการเพาะเลี้ยงระดับ 1,500 มิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดลำไยอบแห้งและลำไยสดเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในสภาวะที่มีการเติมอากาศบางส่วน

ทำตามขั้นตอนที่ 3.4.2.1 และ 3.4.2.2 จากการทดลองที่ 3.4.2 แต่เพิ่มปริมาตรเป็นการเพาะเลี้ยงในระดับ 15 และ 150 มิลลิลิตร ในสภาวะตั้งนิ่ง แล้วเติมกล้าเชื้อลงในขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ที่ถูกดัดแปลงให้สามารถเติมอากาศได้ดังภาพ 3.4 ซึ่งบรรจุสารสกัดลำไยสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนเข้มข้นแล้ว ทำการหมักแบบตั้งนิ่งโดยมีการเติมอากาศนาน 12 ชั่วโมง แล้วหมักแบบไม่มีการเติมอากาศต่อไปจนครบ 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 4 หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร ที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ดังแสดงไว้ดังภาพ 3.5 ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.4.2 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (จำนวนจุลินทรีย์ × จำนวนขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ซ้ำ × ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง 11 ช่วง × จำนวน 4 ซ้ำ จากแต่ละขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ: 2 × 2 × 11 × 4 = 176 ตัวอย่าง)

ภาพ 3.4 ชุดเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ระดับ 1,500 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ 1) ปั๊มลม 2) ท่ออากาศเข้า 3) ชุดกรองอากาศ (air filtration unit) ทำจาก polyte-trafluoroethylene (PTFE) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร 4) ท่ออากาศเข้า 5) ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ 6) ท่อเก็บตัวอย่าง 7) ท่อก๊าซออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.5 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ระดับ 1,500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทบทวนเอกสารพบว่า มีการศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5606 โดยใช้สารสกัดลำไยอบแห้งและแหล่งอาหารอื่นเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในระ- ดับ 1,500 มิลลิลิตร มาแล้วหลายครั้ง (ตติยาและคณะ, 2552; รติกรและคณะ, 2552; พรรณทิวาและคณะ, 2551; พูนศิริและคณะ, 2551) จึงทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกรณีดังกล่าวเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมและเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้

ทำการคำนวณพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

1. ค่าความแตกต่างของค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ ระหว่างที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย (TSS Change : initial level – final level, องศาบริกซ์)
2. ค่าความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่างที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย (OD600 Change : final level – initial level, หน่วยค่าการดูดกลืนแสง)
3. ค่าความแตกต่างของค่าความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้งที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้าย (X Change : final level – initial level, กรัมต่อลิตร)
4. ค่าเฉลี่ยระดับความเป็นกรดด่าง (average pH level)
5. อัตราการลดลงเฉลี่ยของค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (average rate of TSS decreasing, องศาบริกซ์ต่อชั่วโมง)
6. อัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (average rate of OD600 increasing, หน่วยการดูดกลืนแสงต่อชั่วโมง)
7. อัตราการเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้ง (average rate of X increasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
8. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (average specific growth rate, ต่อชั่วโมง)
9. เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์เป็น 2 เท่า (average doubling time, ชั่วโมง)
10. อัตราการลดลงสูงสุดของค่าของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (maximum rate of TSS decreasing, องศาบริกซ์ต่อชั่วโมง)
11. อัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุดของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (maximum rate of OD600 increasing, หน่วยค่าการดูดกลืนแสงต่อชั่วโมง)
12. อัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุดของความเข้มข้นมวลชีวภาพแห้ง (maximum rate of X increasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, ต่อชั่วโมง)
14. เวลาน้อยสุดที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์เป็น 2 เท่า (minimum doubling time, ชั่วโมง)
15. อัตราการลดลงของน้ำตาลซูโครส (sucrose decreasing rate, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
16. อัตราการลดลงของน้ำตาลกลูโคส (glucose decreasing rate, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
17. อัตราการลดลงของน้ำตาลฟรุกโตส (fructose decreasing rate, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
18. อัตราการผลิตเอทานอล (ethanol producing rate, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
19. สัดส่วนการผลิตเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง (yield 24 h, กรัม เอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป)
20. สัดส่วนการผลิตเอทานอลที่ 36 ชั่วโมง (yield 36 h, กรัม เอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป)
21. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครส (average rate of sucrose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
22. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคส (average rate of glucose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
23. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลฟรุกโตส (average rate of fructose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
24. อัตราการผลิตเอทานอลเฉลี่ย (average rate of ethanol producing, กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
25. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลซูโครสจำเพาะ (average specific rate of sucrose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
26. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสจำเพาะ (average specific rate of glucose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
27. อัตราการลดลงเฉลี่ยของน้ำตาลฟรุกโตสจำเพาะ (average specific rate of fructose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
28. อัตราเฉลี่ยการผลิตเอทานอลจำเพาะ (average specific rate of ethanol producing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
29. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลซูโครส (maximum rate of sucrose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

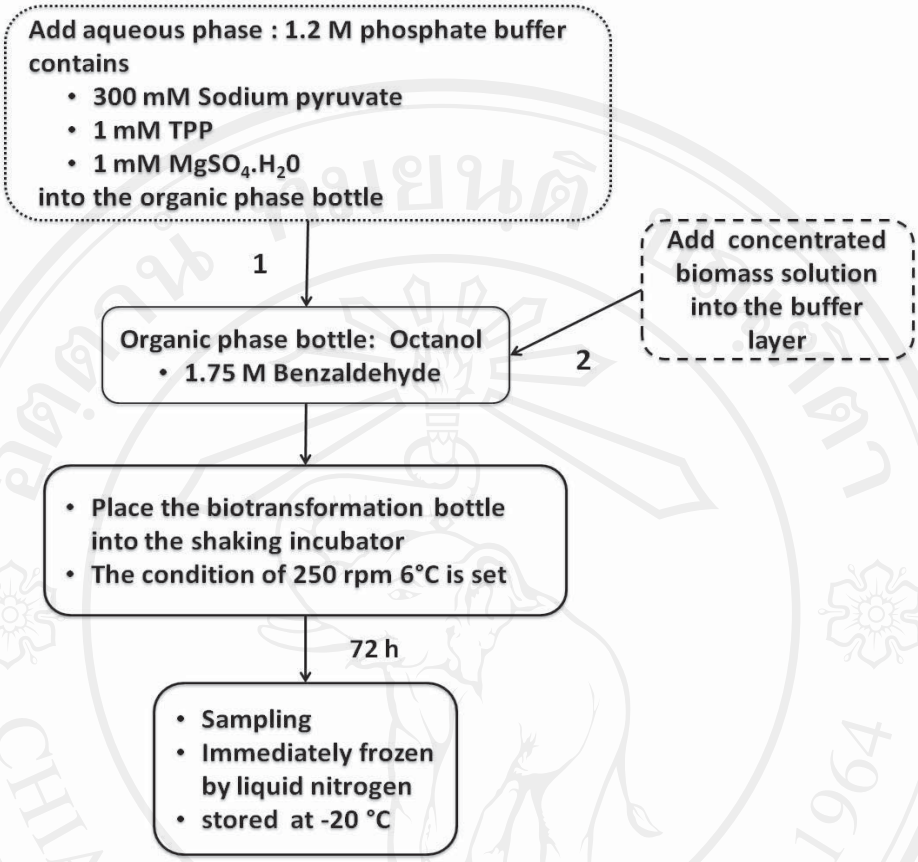
30. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลกลูโคส (maximum rate of glucose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
31. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลฟรุกโตส (maximum rate of fructose decreasing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
32. อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด (maximum rate of ethanol producing, กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
33. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลซูโครสจำเพาะ (maximum specific rate of sucrose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
34. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลกลูโคสจำเพาะ (maximum specific rate of glucose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
35. อัตราการลดลงสูงสุดของน้ำตาลฟรุกโตสจำเพาะ (maximum specific rate of fructose decreasing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
36. อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะสูงสุด (maximum rate of ethanol producing, กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง

วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลที่คำนวณได้ทางสถิติตามวิธีของ Skoog *et al.* (1996)

3.4.4 การศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้น PAC ที่ผลิตได้จากกระบวนการไบโอทรานส์-ฟอร์เมชั่นระบบของเหลวสองชั้นแบบแยกชั้น ด้วยเซลล์รวมที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *S. cerevisiae* TISTR 5606 และ *S. cerevisiae* TISTR 5020 โดยใช้สารสกัดลำไยอบแห้งและลำไยสดเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

นำน้ำหมักที่ได้ตอนที่ 3.4.3 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร มาปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที (4,746×g) ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร (Sorvall, Model No. Super T21) เพื่อแยกมวลชีวภาพ จากนั้นปรับความเข้มข้นมวลชีวภาพเปียกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีระดับความเป็นกรดด่าง 6.0 เข้มข้น 1.2 โมลาร์ ให้ได้เท่ากับ 12.24 และ 24.48 กรัมต่อลิตร เทียบเท่าน้ำหนักมวลชีวภาพแห้ง ตามวิธีในภาคผนวก ฑ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3.6 กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นระบบของเหลวสองชั้นแบบแยกชั้นในอัตราส่วน1:1

ระบบของเหลวสองชั้นประกอบด้วยชั้นบัฟเฟอร์และชั้นสารอินทรีย์ โดยในชั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ประกอบด้วย โซเดียมไพรูเวตความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และใช้โคแฟกเตอร์ได้แก่ ไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate, TPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ $MgSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่วนในชั้นของสารอินทรีย์ซึ่งใช้ออกทานอลเป็นตัวทำละลาย ประกอบด้วยเบนซาลดีไฮด์ความเข้มข้น 1.75 โมลาร์ เติมเซลล์รวมลงในขวดไบโอทรานส์ฟอร์เมชั่นที่ชั้นบัฟเฟอร์ (วิธีการเตรียมเซลล์รวมแสดงไว้ในภาคผนวก ฑ) เขย่าขวดในแนวระดับนาน 20 วินาที จากนั้นนำไปบ่มต่อในเครื่องบ่มแบบเขย่า (orbital shaking incubator) โดยใช้อัตราเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 6

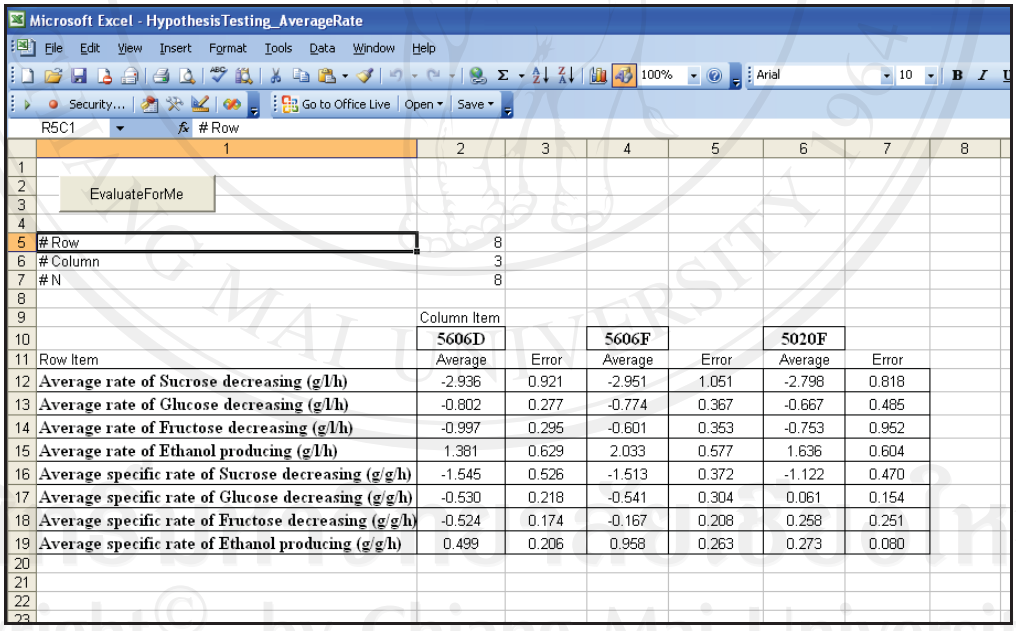
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง โดยจัดวางขวดทดลองในตำแหน่งที่การแกว่งทำให้ชั้นสารเกิดการแยกชั้น ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยไนโตรเจนเหลว (ภาพ 3.6)

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฟีนิลแอซิติลคาร์บินอล (Rosche, 2001) ระดับความเป็นกรดด่าง และสัดส่วนโดยปริมาตรชั้นสารอินทรีย์ต่อชั้นบัฟเฟอร์

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธีทดสอบสมมติฐานทางสถิติ (hypothesis testing) ของ Skoog *et al*. (1996) และโปรแกรมตรวจสอบสมมติฐานความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (NLST_Diff version 1.0) สัญลักษณ์ ว1.3281 (นพพล, 2552) ดังแสดงไว้ในภาพ 3.7 – 3.8



Microsoft Excel - HypothesisTesting_AverageRate

File Edit View Insert Format Tools Data Window Help

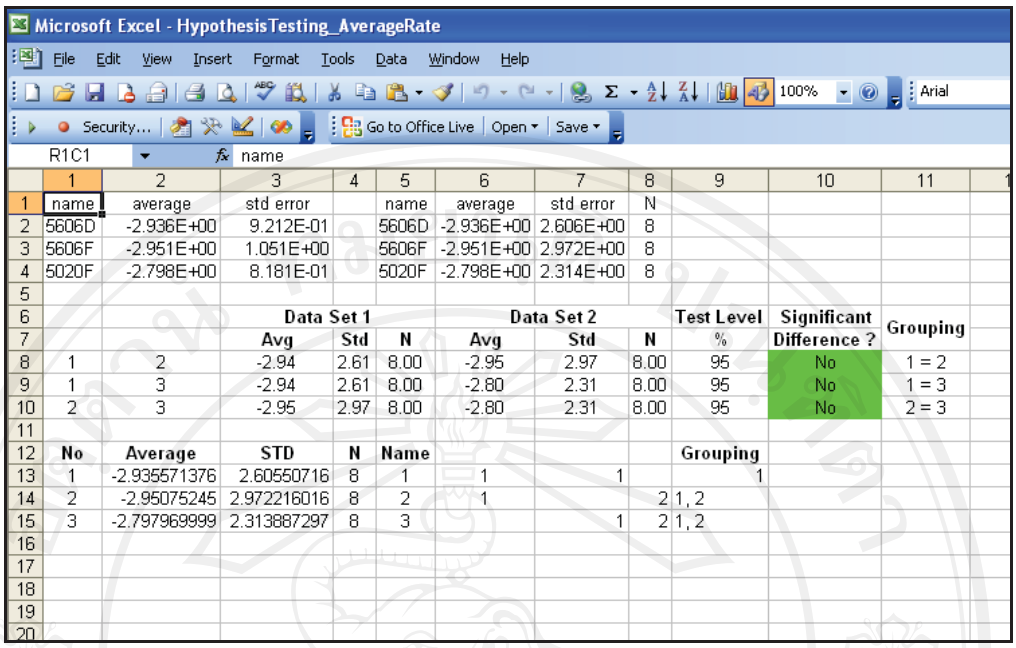
R5C1 # Row

EvaluateForMe

5	# Row	8					
6	# Column	3					
7	# N	8					
9		Column Item					
10		5606D		5606F		5020F	
11	Row Item	Average	Error	Average	Error	Average	Error
12	Average rate of Sucrose decreasing (g/l/h)	-2.936	0.921	-2.951	1.051	-2.798	0.818
13	Average rate of Glucose decreasing (g/l/h)	-0.802	0.277	-0.774	0.367	-0.667	0.485
14	Average rate of Fructose decreasing (g/l/h)	-0.997	0.295	-0.601	0.353	-0.753	0.952
15	Average rate of Ethanol producing (g/l/h)	1.381	0.629	2.033	0.577	1.636	0.604
16	Average specific rate of Sucrose decreasing (g/g/h)	-1.545	0.526	-1.513	0.372	-1.122	0.470
17	Average specific rate of Glucose decreasing (g/g/h)	-0.530	0.218	-0.541	0.304	0.061	0.154
18	Average specific rate of Fructose decreasing (g/g/h)	-0.524	0.174	-0.167	0.208	0.258	0.251
19	Average specific rate of Ethanol producing (g/g/h)	0.499	0.206	0.958	0.263	0.273	0.080

ภาพ 3.7 แผ่นงานสำหรับกรอกค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนที่ต้องการเปรียบเทียบกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



Microsoft Excel - HypothesisTesting_AverageRate

File Edit View Insert Format Tools Data Window Help

Security... Go to Office Live Open Save

R1C1 name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	name	average	std error		name	average	std error	N			
2	5606D	-2.936E+00	9.212E-01		5606D	-2.936E+00	2.606E+00	8			
3	5606F	-2.951E+00	1.051E+00		5606F	-2.951E+00	2.972E+00	8			
4	5020F	-2.798E+00	8.181E-01		5020F	-2.798E+00	2.314E+00	8			
5											
6			Data Set 1			Data Set 2			Test Level	Significant	Grouping
7			Avg	Std	N	Avg	Std	N	%	Difference ?	
8	1	2	-2.94	2.61	8.00	-2.95	2.97	8.00	95	No	1 = 2
9	1	3	-2.94	2.61	8.00	-2.80	2.31	8.00	95	No	1 = 3
10	2	3	-2.95	2.97	8.00	-2.80	2.31	8.00	95	No	2 = 3
11											
12	No	Average	STD	N	Name				Grouping		
13	1	-2.935571376	2.60550716	8	1	1	1		1		
14	2	-2.95075245	2.972216016	8	2	1		2	1, 2		
15	3	-2.797969999	2.313887297	8	3		1	2	1, 2		
16											
17											
18											
19											
20											

ภาพ 3.8 แผ่นงานแสดงผลการเปรียบเทียบทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved