การคัดกรอง *Clostridium* spp. ทนบิวทานอลเพื่อผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อย

นางสาวพรรณธิภา ส่งเสริมพานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING OF BUTANOL-TOLERANT *Clostridium* spp. FOR PRODUCING BUTANOL FROM SUGARCANE JUICE

Miss Phanthipa Songsermpanit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรอง *Clostridium* spp. ทนบิวทานอลเพื่อผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อย
โดย	นางสาวพรรณธิภา ส่งเสริมพานิช
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

……กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ)

พรรณธิภา ส่งเสริมพานิช: การคัดกรอง *Clostridium* spp. ทนบิวทานอลเพื่อผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อย. (SCREENING OF BUTANOL-TOLERANT *Clostridium* spp. FOR PRODUCING BUTANOL FROM SUGARCANE JUICE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 83 หน้า.

ไบโอบิวทานอลและไบโอเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพเหลวที่สามารถผลิตได้จากมวลชีวภาพด้วยกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Clostridium* spp. จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและมูลสัตว์ในประเทศไทยสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพโดยใช้อาหารสังเคราะห์ modified MS media ที่มีน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรรวมกับกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร พาราอะมิโนเบนโซอิก แอซิดและไบโอตินถูกเติมเพื่อเป็นวิตามินร่วมกับบิวทานอลความเข้มข้น 1% ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักถูกวิเคราะห์ร่วมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี 16 ไอโซเลทและ 22 ไอโซเลทของแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนคัดแยกได้จากน้ำข้าวฟ่างหวานและมูลวัวที่เก็บจากจังหวัดสระบุรีและจังหวัดปทุมธานีตามลำดับ มีเพียง 25 ไอโซเลทที่แสดงลักษณะของ *Clostridium* spp. โดยมีเกณฑ์ที่ใช้ในการบ่งชี้ คือ แกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์เคลื่อนที่ได้ สามารถรีดิวส์ซัลไฟท์และสามารถผลิตตัวทำละลายได้ แต่ไม่รีดิวส์ไนเตรท ไม่สร้าง lecithinase และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งบ่งชี้ในเบื้องต้นว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรค ไอโซเลท CG1 ที่คัดแยกได้จากมูลวัวสามารถผลิตบิวทานอล เอทานอลและอะซิโตนความเข้มข้นสูงที่สุด 3.67 2.11 และ 0.02 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และสามารถทนต่อบิวทานอลความเข้มข้นสูงสุดที่ 12 กรัมต่อลิตร ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ไอโซเลท CG1 ผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 9.9 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 144 และผลิตเอทานอลและอะซิโตนได้ 4.28 และ 0.27 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2553..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5172376323: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: Biofuel/ Anaerobic bacteria/ *Clostridium* spp.

PHANTHIPA SONGSERMPANIT: SCREENING OF BUTANOL-TOLERANT *Clostridium* spp. FOR PRODUCING BUTANOL FROM SUGARCANE JUICE. ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, 83 pp.

Biobutanol and bioethanol are liquid biofuels that can be produced from biomass by group of anaerobic bacteria. The objective of this study is to screen anaerobic bacteria especially *Clostridium* spp. from agricultural waste and dung in Thailand for biofuel production. The modified synthetic MS media are 30 g L^{-1} of sucrose mixed with 30 g L^{-1} of glucose were used to isolation. Para-aminobenzoic acid and biotin were added as additional vitamin. Modified MS media was supplemented with 1% butanol. Fermentation products were determined first. Morphology and biochemical reaction in each isolate were analyzed. Sixteen and twenty two isolates of anaerobic bacteria were screened from sweet sorghum bagasse and cow dung that were collected from Saraburi and Pathumthani provinces in Thailand, respectively. But twenty five of them showed *Clostridium* spp. characteristics are gram positive, rod-shape, sub-terminal spore-forming, motile, sulfite-reducing and produce solvent. They can't reduce nitrate, not produce lecithinase activity and non-haemolysis were identified as primary criteria to non pathogen. From all isolates, isolate CG1 from cow dung was produce the highest concentrations of butanol ethanol and acetone reaches 3.61, 2.11 and 0.02 g L^{-1} respectively and tolerant to butanol concentration of 12 g L^{-1}. In bioreactor 5 L, isolate CG1 has produced the highest concentrations of butanol ethanol and acetone reaches to 9.9 g L^{-1} and 4.28 and 0.27 g L^{-1} at 144 hrs respectively.

Field of Study: Biotechnology Student's Signature .....

Academic Year: 2010 Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความสนับสนุนและช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและตรวจทานรายละเอียดต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า อาจารย์ ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้ข้อเสนอแนะ รวมถึงข้อคิดเห็นที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ และสถาบันวิจัยและเทคโนโลยี บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) สำหรับเงินทุนสนับสนุนตลอดงานวิจัย

ขอขอบคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับความช่วยเหลือด้วยดีจากเจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่าน จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ สำหรับความรู้และประสบการณ์รูปแบบต่าง ๆ ตลอดจน ทุนสนับสนุนการวิจัย สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือทั้งหมดในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่คอยเอื้อเฟื้อ และช่วยเหลือ ตลอดการทำงานวิจัย จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก ให้กำลังใจและความห่วงใยเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…….. ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..... จ

กิตติกรรมประกาศ…….. ฉ

สารบัญ…….. ช

สารบัญตาราง…… ฎ

สารบัญภาพ……... ฏ

บทที่ 1 บทนำ……. 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา…….. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…….. 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..…… 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……... 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 4

2.1 บิวทานอล…..…… 4

2.2 ที่มาของการผลิตบิวทานอล……. 7

2.3 การผลิตบิวทานอล…….…… 8

2.3.1 กระบวนการหมัก…… 8

2.3.2 การหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล……. 10

2.3.3 อาหารสำหรับกระบวนการหมัก……. 11

2.3.4 ออกซิเจน…… 13

2.3.5 ค่าความเป็นกรดด่าง…….. 13

2.3.6 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย…….. 14

2.4 ลักษณะสายพันธุ์ที่ผลิตบิวทานอล……..…… 14

2.5 เศรษฐศาสตร์ของการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล..…..…….. 16

2.6 ประโยชน์จากบิวทานอล…… 18

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 20

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย…….. 26
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย……... 26
สารเคมี……. 27
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย……. 28
3.2 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Clostridium* spp. 29
3.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ……..... 29
3.3.1 การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์……. 29
3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสเบื้องต้น…….. 30
3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้…….…… 31
3.4.1 ศึกษาลักษณะ รูปร่างของเซลล์…….. 31
3.4.2 การวัดการเจริญ……. 31
3.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่……. 31
3.4.4 การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท……. 31
3.4.5 การทดสอบการสร้าง lecithinase……. 32
3.4.6 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง……..……. 32
3.4.7 การทดสอบการรีดิวส์ซัลไฟท์ ……..…… 32
3.5 การเตรียมจุลินทรีย์…… 33
3.5.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง…… 33
3.5.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์…….. 33
3.6 การศึกษาความทนบิวทานอลและการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp……..…… 33
3.6.1 การศึกษาความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้. 33
3.6.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp……. 34
3.7 ทดสอบการหมักแบบไร้ออกซิเจนจาก *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร……. 34

หน้า

3.8 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก..... 34
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล..... 36
4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย..... 36
4.2 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Clostridium* spp. 37
4.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ..... 39
4.3.1 การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์..... 39
4.3.2 การคัดเลือกเบื้องต้น..... 40
4.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้..... 43
4.4.1 ศึกษาลักษณะ รูปร่างของเซลล์และสปอร์..... 43
4.4.2 การวัดการเติบโต..... 43
4.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่..... 44
4.4.4 การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท..... 45
4.4.5 การทดสอบการสร้าง lecithinase..... 46
4.4.6 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง..... 47
4.4.7 การทดสอบการรีดิวส์ซัลไฟท์..... 47
4.5 การศึกษาความทนบิวทานอลและการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp..... 49
4.5.1 การศึกษาความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้. 49
4.5.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp..... 50
4.6 ทดสอบการหมักแบบไร้ออกซิเจนจาก *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร..... 53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 58
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 58
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 59
รายการอ้างอิง..... 60
ภาคผนวก..... 68

หน้า

ภาคผนวก ก..... 69
ภาคผนวก ข..... 72
ภาคผนวก ค..... 75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของบิวทานอล……..	5
2.2	คุณสมบัติอื่น ๆ ของบิวทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับแก๊สโซลีน เอทานอลและเมทานอล……..	6
2.3	การผลิตบิวทานอลในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก.....	16
4.1	การเจริญของ *Clostridium* spp.ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตรจากแต่ละตัวอย่าง.	38
4.2	จำนวนไอโซเลทจากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ ที่เจริญในอาหารที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร……..……...	40
4.3	ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้……..….	41
4.4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้……	48
4.5	ความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้สูงสุด 5 ไอโซเลท……	50
4.6	ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักในวันที่ 7 ในอาหารเหลว Modified MS medium ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน…….	52
4.7	ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักในวันที่ 7 ในอาหารเหลว Modified MS medium ที่ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน……..	52
ค-1	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานผสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส…….	76
ค-2	ปริมาณสารที่ใช้ในการทำสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร…….	78
ค-3	ปริมาณสาร Stock mix solvent ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน…….	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล…….……..……..	4
2.2	กระบวนการหลักในกระบวนการหมัก……..…….……...	9
2.3	วิถีเมแทบอลิซึมใน *C. acetobutylicum* ปฏิกิริยาที่เป็นช่วงของการสร้างกรดและการสร้างตัวทำละลาย ……..……	11
2.4	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Micrographs, SEM) ของ *C. acetobutylicum*……	15
	(ก) Vegetative cells……..……...	15
	(ข) เซลล์ในรูปสปอร์…….……	15
3.1	ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Bactron Anaerobic Chamber)……..……..	30
3.2	แผนภาพแสดงรูปร่าง ระดับความนูนและขอบของโคโลนีแบคทีเรีย……..	30
4.1	ตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ……..……..……	36
	(ก) น้ำเสียจุดที่ 1……	36
	(ข) น้ำเสียจุดที่ 2……	36
	(ค) น้ำเสียจุดที่ 3……	36
	(ง) น้ำเสียจุดที่ 4……	36
	(จ) น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40…….	36
	(ฉ) กากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40……...	36
	(ช) ชานอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา……..	36
	(ซ) มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร จังหวัดปทุมธานี……..	36
	(ญ) มูลวัวจากพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน กรุงเทพมหานคร…….	36
	(ฎ) มูลวัวจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา……..……..	37
	(ฎ) มูลควายจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา…….	37
	(ฐ) มูลช้างจากวังช้างอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา……..	37

ภาพที่ หน้า

4.2 โคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. บนอาหาร modified MS agar plate……. 39

(ก) ที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร……. 39

(ข) ที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร……. 39

4.3 อาหาร Modified MS medium……. 41

(ก) ขวดควบคุม…….. 41

(ข) การสร้างแก๊สของเชื้อ *Clostridium* spp. ภายในขวด……..…… 41

4.4 (ก) รูปร่างเซลล์ของเชื้อ *Clostridium* spp……. 43

(ข) ลักษณะของสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์…….. 43

4.5 การเจริญของไอโซเลท CG1 ในอาหาร Modified MS medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน…. 44

4.6 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้…….... 44

(ก) เชื้อ *Escherichia coli*…….. 44

(ข) เชื้อ *Staphylococcus aureus*…… 44

(ค) ไอโซเลท CG1…….. 44

4.7 ความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรท *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้……..… 45

(ก) หลอดควบคุมหลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง…….. 45

(ข) ไอโซเลท SG13 หลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง…….. 45

(ค) ผลของหลอดควบคุมเมื่อเติมสารละลาย A และสารละลาย B…… 45

(ง) ผลของไอโซเลท SG13 เมื่อเติมสารละลาย A และสารละลาย B…… 45

(จ) ผลของหลอดควบคุมเมื่อเติมผงสังกะสี……... 45

(ฉ) ผลของไอโซเลท SG13 เมื่อเติมผงสังกะสี……..... 45

4.8 (ก) Plate ที่เกลี่ยด้วยไอโซเลท CG1……..... 46

(ข) Plate ที่เกลี่ยด้วยไอโซเลท CA9..... 46

4.9 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน sheep blood agar plate ของไอโซเลท CG1..... 47

4.10 (ก) สีของโคโลนีและอาหารเมื่อขีดลากด้วยไอโซเลท SS1……..... 47

(ข) สีของโคโลนีและอาหารเมื่อขีดลากด้วยไอโซเลท CG1……..…… 47

4.11 การเจริญของ *Clostridium* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทในระยะเวลา 7 วัน……. 51

4.12 ถังหมักขนาด 5 ลิตร……..…… 54

ภาพที่		หน้า
4.13	การเจริญของไอโซเลท CG1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน……	54
4.14	ค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อหมักด้วยไอโซเลท CG1 เป็นระยะเวลา 7 วัน……..	55
4.15	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่เหลือจากการหมักของไอโซเลท CG1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน……..	55
4.16	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ไอโซเลท CG1 ผลิตขึ้นในถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน…….....	56
ค-1	กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส……..	77
ค-2	กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส……...	77
ค-3	กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลฟรุกโตส……	77
ค-4	โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสมาตรฐาน 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ……..	78
ค-5	กราฟมาตรฐานของอะซิโตน……..	80
ค-6	กราฟมาตรฐานของเอทานอล……	80
ค-7	กราฟมาตรฐานของบิวทานอล……..	80
ค-8	กราฟมาตรฐานของกรดอะซิติก……	81
ค-9	กราฟมาตรฐานของกรดบิวทิริก……	81
ค-10	โครมาโทแกรมของอะซิโตน เอทานอล internal standard บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมาตรฐาน 4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ……..……	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วิกฤตการณ์พลังงานที่เกิดขึ้นอย่างรุนแรงทั่วโลก โดยเฉพาะปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกที่ถูกปั่นราคาให้ขึ้นไปแตะระดับที่สูงกว่า 80 เหรียญสหรัฐฯ ต่อบาร์เรล ได้ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกเกี่ยวกับน้ำมันที่กำลังจะหมด แต่ความเป็นจริงก็ คือ ในระยะสั้น การผลิตไฟฟ้าในระดับใหญ่ ยังต้องพึ่งพิงเชื้อเพลิงฟอสซิลอยู่แต่ในระยะยาวอาจจะต้องพึ่งพิงพลังงานนิวเคลียร์ ด้วยราคาน้ำมันในปัจจุบันที่เพิ่มสูงเป็นประวัติการณ์ด้วยตัวเร่งคือสถานการณ์สงครามและการเมือง แต่ด้วยปัจจัยพื้นฐาน คือ “ความต้องการ” ที่มากกว่า “ความสามารถในการผลิต” โดยเฉพาะความต้องการพลังงานมหาศาลเพื่อมารองรับการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจจีนและเศรษฐกิจอินเดียสองยักษ์หลับที่กำลังไต่ระดับการพัฒนาเศรษฐกิจขึ้นมา ทำให้ปัจจุบันเริ่มมีการถามถึงพลังงานทางเลือกหรือพลังงานทดแทนเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งประเทศไทยที่เริ่มมีนโยบายให้เพิ่มการใช้พลังงานทดแทนเพิ่มขึ้น เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีพื้นฐานทางการเกษตรกรรม มีผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมแปรรูปอยู่มากมาย โดยที่ผลผลิตหลักและเศษวัสดุหรือของเหลือจากทั้ง 2 ภาคเศรษฐกิจสามารถนำมาใช้ประโยชน์หรือแปรรูปให้เป็นพลังงานหรือเชื้อเพลิงเพื่อทดแทนการใช้พลังงานจากฟอสซิล ซึ่งส่วนใหญ่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศและจะหมดไปจากโลกในอนาคต ในขณะที่พลังงานชีวมวลถือได้ว่าเป็นพลังงานทดแทนชนิดหนึ่ง เนื่องจากการปลูกพืชทดแทนจะมีต่อเนื่องตลอดไปในอนาคตถ้าหากเรามีการจัดการในภาคเกษตรกรรมที่ดี

ไบโอบิวทานอล (Biobutanol) เชื้อเพลิงพลังงานชีวภาพที่เป็นทางเลือกพลังงานทดแทนที่เกิดขึ้นใหม่ (Renewable energy) เป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากกระบวนการหมัก (Fermentation–derived butanol) สามารถแข่งขันได้โดยไม่ต้องมีมาตรการอุดหนุน (Subsidies) หากราคาน้ำมันดิบอยู่ในช่วง 30-40 เหรียญสหรัฐฯ ต่อบาร์เรล เชื้อเพลิงชีวภาพ 1-บิวทานอล หรือ ไบโอบิวทานอล มีประโยชน์มากมายหลายประการเหนือกว่าเชื้อเพลิงชีวภาพเอทานอล เช่น การที่มีความดันไอต่ำ (Low vapor pressure) และมีเปอร์เซนต์การปนเปื้อนของน้ำน้อยกว่าเอทานอล ปกติแล้วเอทานอลจะดูดโมเลกุลของน้ำและมักจะกัดกร่อนท่อที่ขนส่งน้ำมัน ดังนั้นจึงต้องขนส่งเอทานอลโดยรถบรรทุก รถไฟ และเรือ ในปริมาณค่อนข้างน้อยไปยังแหล่งเก็บ เพื่อนำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงก๊าซโซลีนก่อนจำหน่าย นอกจากนี้เอทานอลยังกัดกร่อนเครื่องยนต์มากกว่าบิวทานอล ทำ

ให้การขนส่งบิวทานอลทางท่อจึงมีความเป็นไปได้มากกว่าเอทานอล ประโยชน์อีกข้อหนึ่งของบิวทานอล ได้แก่ การที่สามารถนำไปผสมกับน้ำมันก๊าซโซลีนในปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าเอทานอลโดยปราศจากการปรับปรุงเครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังมีความประหยัด (Fuel economy) กว่าการที่ใช้เอทานอล กระบวนการผลิตบิวทานอลใช้กระบวนการหมักเช่นเดียวกับการผลิตเอทานอล และสามารถใช้ผลิตผลทางการเกษตรมาผลิตเช่นเดียวกัน เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี น้ำตาล ข้าวฟ่าง และในปัจจุบันกำลังมีการวิจัยเพื่อให้สามารถใช้วัสดุจำพวกที่มีเซลลูโลส (Cellulose-based-crops) เช่น ฟางข้าวโพด หรือ หญ้า เป็นต้น (Hess, 2006)

กระบวนการผลิตบิวทานอลสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Clostridium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตบิวทานอลในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobe) ผ่านกระบวนการอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE fermentation) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้ โดยสปอร์มีรูปร่างได้ทั้งกลมและรี (Tashiro และคณะ, 2005) สามารถพบได้ในรูปสปอร์กระจายทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ของเสีย ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ (อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ, 2548) มีคุณสมบัติในการหมักเซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะบิวทานอล เนื่องจากความต้องการด้านพลังงานและข้อดีของบิวทานอลดังที่กล่าวข้างต้น การคัดเลือกและคัดแยกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตบิวทานอลจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น โดยคัดแยกเชื้อจากสารตั้งต้นหลายประเภทหรือจากแหล่งตัวอย่างที่ต่างกัน ทั้งนี้ได้มีทีมวิจัยสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้จากชีวมวลพืช (Berezina และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีการคัดเลือกจากลำไส้ของวัวและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Virunanon และคณะ, 2008) หรือการปรับปรุงเชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ ATCC824 โดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมจนสามารถผลิตบิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ทำให้มีความคุ้มค่าเมื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Gheshlaghi และคณะ, 2009) แต่การผลิตบิวทานอลยังมีข้อจำกัด คือ ความเป็นพิษของบิวทานอลต่อเซลล์ที่เป็นปัจจัยหลักอันแรกที่จำกัดการเจริญของเซลล์ โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *C. acetobutylicum* หรือ *C. beijerinckii* จะหยุดการผลิตบิวทานอลเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งหมดสูงสุดที่ 20 กรัมต่อลิตร (Qureshi และ Blaschek, 2000) ในกระบวนการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. พบว่านอกจากบิวทานอลแล้ว แบคทีเรียยังมีศักยภาพในการผลิตตัวทำละลายอื่น คือ อะซิโตนและเอทานอล เกิดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบิวทานอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ (Jones และ Woods, 1986)

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ละปีสามารถผลิตน้ำตาลได้ในปริมาณมากทำให้การส่งออกน้ำตาลสูงเป็นอันดับที่ 2 ของโลกรองจากบราซิล (กรุงเทพธุรกิจออนไลน์, 2552) โดยรายงานพยากรณ์พื้นที่เพาะปลูกอ้อยและผลผลิตอ้อยปีการผลิต 2553/54 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6.9 ล้านไร่ ปลูกอ้อยได้ 68 ล้านตัน แปรรูปเป็นน้ำตาล 101 กิโลกรัมต่อตันอ้อย และกากน้ำตาล 43 กิโลกรัมต่อตันอ้อย (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2553) นอกจากนี้อ้อยคั้นน้ำสามารถนำมาคั้นให้น้ำอ้อย 1 ลิตรต่ออ้อย 2 กิโลกรัม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549; ธวัช ตินนังวัฒนะ, 2543) นอกจากนี้น้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำตาล เกลือ สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาลและสารที่ไม่ละลายน้ำ ในส่วนของน้ำตาลในน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครสซึ่งมีปริมาณมากที่สุด (Walford, 1996) จัดว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกแหล่งหนึ่ง

งานวิจัยนี้จึงเป็นการคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Clostridium* spp. จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและมูลสัตว์ในประเทศไทย และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นบิวทานอลในระดับที่เหมาะสมต่อการผลิต โดยใช้น้ำอ้อยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลมากเป็นสารตั้งต้น โดยจุลินทรีย์ที่ได้ควรมีความสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำอ้อยไปเป็นบิวทานอลได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพและการย่อย (Sánchez และ Cardona, 2008)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยก *Clostridium* spp. ทนบิวทานอลจากตัวอย่างในประเทศไทยสำหรับการผลิตบิวทานอล
2. เพื่อผลิตบิวทานอลจาก *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้โดยใช้น้ำอ้อยเป็นสารตั้งต้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ในประเทศไทย
3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้
4. ผลิตบิวทานอลด้วย *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ในอาหารสังเคราะห์และน้ำอ้อย
5. วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก

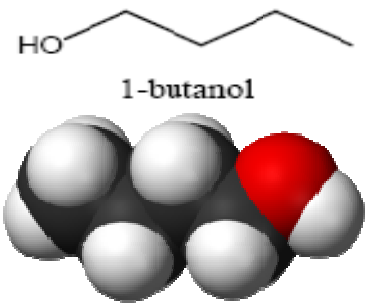
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตบิวทานอลจากเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium* spp. ทนบิวทานอลที่คัดแยกได้
2. ทราบข้อมูลที่สามารถนำไปปรับใช้กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพไร้ออกซิเจนขนาดใหญ่ขึ้นและนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้กับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บิวทานอล

บิวทานอล (IUPAC nomenclature, 1-butanol; CAS no. 71-36-3) เป็นที่รู้จักกันคือ บิวทิลแอลกอฮอล์ (butyl alcohol) หรือเมธิลโลลโพรเพน (methylolpropane) เป็นแอลกอฮอล์สายเดี่ยวที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบเป็นอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 4 ตัว (4-carbon aliphatic alcohol) สายตรงดังภาพที่ 2.1 มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น C_4H_9OH น้ำหนักโมเลกุล 74.12 กรัมต่อโมล มีลักษณะใส ไม่มีสี ติดไฟได้ เป็นของเหลวที่มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำอ่อน ๆ มีกลิ่นคล้ายกล้วยและมีกลิ่นแอลกอฮอล์รุนแรง ระคายเคืองต่อตาและผิวหนังเมื่อสัมผัสโดยตรง สามารถผสมรวมกับสารทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์แต่แยกกับน้ำ (Lee และคณะ, 2008a; Dürre, 2008) สารเคมีอื่น ๆ ที่เป็นแอลกอฮอล์กลุ่มเดียวกัน คือ เมทานอล (คาร์บอน 1 คาร์บอนเป็นองค์ประกอบ) เอทานอล (2 คาร์บอน) และโพรพานอล (3 คาร์บอน) (Brekke, 2007) โดยพบว่าบิวทานอลมีคุณสมบัติเด่นบางประการที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวดังแสดงในตารางที่ 2.1และ 2.2



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของบิวทานอล (Gholizadeh, 2009)

ตารางที่ 2.1. คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของบิวทานอล (ประยุกต์จาก Davis และ Morton, 2008; Lee และคณะ, 2008a)

คุณสมบัติ	**บิวทานอล**
จุดหลอมเหลว (Melting point) (°C)	- 89.3
ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity)	0.810– 0.812
อุณหภูมิในการจุดระเบิด (Ignition temperature) (°C)	35–37
อุณหภูมิในการจุดระเบิดอัตโนมัติ (Auto-ignition temperature) (°C)	343–345
จุดวาบไฟ (Flash point) (°C)	25–29
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (Relative density) (น้ำ: 1.0)	0.81
ความดันวิกฤต (Critical pressure) (hPa)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (Critical temperature) (°C)	287
ขอบเขตการระเบิด (Explosive limits) (vol. % in air)	1.4–11.3
การละลายน้ำ (Water solubility)	9.0 มล. /100 มล. (7.7 กรัม/100 มล 20)°C)
ความหนาแน่นสัมพัทธ์ของไอ (Relative vapor density) (อากาศ: 1.0)	2.6
ความดันไอ (Vapor pressure) (kPa ที่ 20°C)	0.58

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติอื่น ๆ ของบิวทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับแก๊สโซลีน เอทานอลและเมทานอล

คุณสมบัติ	**บิวทานอล**	**แก๊สโซลีน**	**เอทานอล**	**เมทานอล**
จุดเดือด (Boiling point) (°C)	117–118	27–221	78	64.7
ความหนาแน่น (Density) ที่ 20°C (กรัม/มล.)	0.8098	0.7–0.8	0.7851	0.7866
การละลาย (Solubility) ใน 100 กรัม ของน้ำ	Immiscible	Immiscible	Miscible	Miscible
ความหนาแน่นของพลังงาน (Energy density) ($MJ.l^{-1}$)	27–29.2	32	19.6	16
Energy content/value (BTU/gal)	110000	115000	84000	76000
Air-fuel ratio	11.2	14.6	9	6.5
ความร้อนของการกลายเป็นไอ (Heat of vaporization) (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
Liquid heat capacity (Cp) at STP (kJ/k-mol.^{o}K)	178	160–300	112.3	81.14
Research octane number	96	91–99	129	136
Motor octane number	78	81–89	102	104
Octanol/Water partition coefficient (as $logP_{o/w}$)[a]	0.88	3.52±0.62	-0.31	-0.77
Dipole moment (polarity)	1.66	n.a.	1.7	1.6
ความหนืด (Viscosity) (10^{-3} Pa.s)	2.593	0.24–0.32	1.078	0.5445

หมายเหตุ : [a)] LogP คือ ปริมาณของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Lipophilicity) และเหมือนกันกับส่วนที่มีขั้ว สำหรับแอลกอฮอล์ทั้งสาม ค่าเหล่านี้ได้มาจาก Hansch และ Hoekman, (1995) และ LogP ของแก๊สโซลีน คือ ค่าประมาณอย่างคร่าว ๆ เป็นน้ำหนักเฉลี่ยขององค์ประกอบที่เป็นตัวแทนหลัก

2.2 ที่มาของการผลิตบิวทานอล

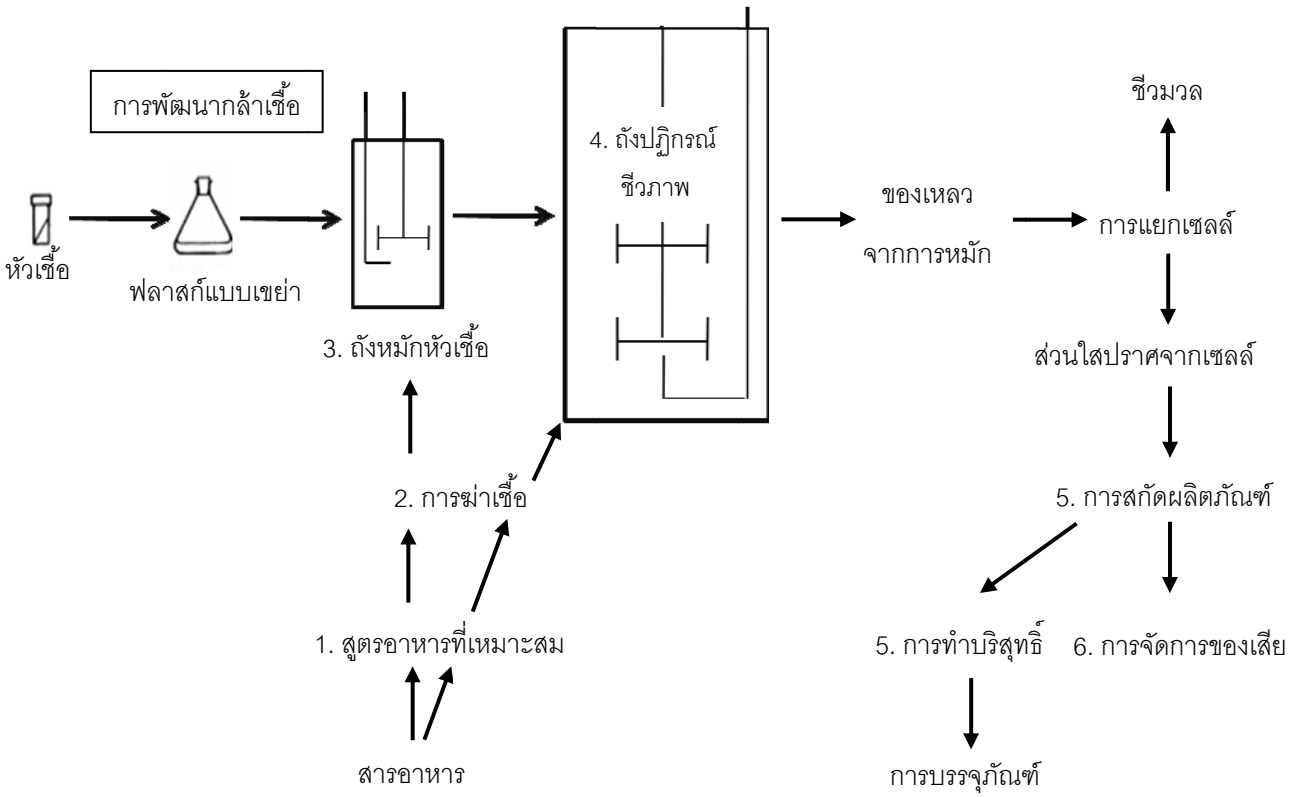
การผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลโดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Clostridium* spp. เริ่มต้นโดย Chaim Weizmann นักเคมีชาวรัสเซีย ซึ่งต่อมาได้ย้ายมาทำงานในประเทศอังกฤษ เขาได้เข้าร่วมในโครงการผลิตยางสังเคราะห์จากการหมักของจุลินทรีย์และคัดแยกเชื้อที่เขาเรียกว่า 'BY' ต่อมาคือ *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์รวมถึงความสามารถในการใช้สารตั้งต้นจำพวกแป้งได้หลายชนิดและผลิตบิวทานอลได้มากกว่าเชื้อดั้งเดิม (Jones และ Woods, 1986) ในยุคสงครามโลกครั้งที่ 1 กองทัพอังกฤษต้องการ cordite ที่มีอะซีโตนเป็นผลิตภัณฑ์ในการผลิต ในขณะที่บิวทานอลเป็นเพียงผลพลอยได้ที่เก็บสะสมในปริมาณมาก หลังจากสงครามจึงความพยายามนำบิวทานอลกลับมาใช้ ในขณะนั้นอุตสาหกรรมยานยนต์ได้ขยายตัวขึ้นอย่างรวดเร็วและต้องการแล็คเกอร์ที่แห้งอย่างรวดเร็วซึ่งจะช่วยให้โครงร่างของรถเสร็จได้เป็นอย่างดี E. I. du Pont de Nemours & Co เป็นบริษัทแถวหน้าของการพัฒนาของไนโตรเซลลูโลสแล็คเกอร์ (nitrocellulose lacquer)และการพัฒนากระบวนการในการผลิตไนโตรเซลลูโลสความหนืดต่ำเพื่อเปิดทางสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตแล็คเกอร์เหล่านี้ ส่งผลต่อความต้องการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม และพบว่าบิวทานอลและเอสเตอร์ของมัน คือ บิวทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสำหรับแล็คเกอร์เหล่านี้ (Jones และ Woods, 1986) อุตสาหกรรมการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE) โดยใช้จุลินทรีย์ *Clostridium* spp. ประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง ในช่วงแรกของศตวรรษที่ 20 การผลิตอะซีโตน-บิวทานอลโดยจุลินทรีย์เดี่ยวและบริสุทธิ์นับเป็นการผลิตสารเคมีระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ด้วยจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการหมักขนาดใหญ่ภายใต้ภาวะปราศจากเชื้อ ดังนั้นจึงมีการเล็งเห็นถึงความสำคัญของการพัฒนาต่อในกระบวนการและเทคโนโลยีสมัยใหม่ การหมักเพื่อให้ได้ ABE ดำเนินต่อมาในสหรัฐอเมริกาจนกระทั่งในปี 1950 (Dürre, 2008) ในช่วงทศวรรษ 1950-1960 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้ ABE ในยุโรปและอเมริกาเหนือหยุดชะงักโดยสมบูรณ์เนื่องจากไม่สามารถแข่งขันกับวิธีการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีได้ กระบวนการผลิต ABE ในประเทศจีนเกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1950 ถึงยุครุ่งเรืองที่สุดในปี 1980 และจบลงในปลายปี 1990 ด้วยเหตุผลทางเศรษฐกิจที่เสียเปรียบผลิตภัณฑ์เดียวกันกับที่ผลิตโดยอุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่เนื่องจากการใช้น้ำมันปิโตรเลียมและราคาที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบัน การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อทดแทนบางส่วนของการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิลเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งทั่วโลก เมื่อเปรียบเทียบเชื้อเพลิงทดแทนทั้งหมดแล้ว ไบโอบิวทานอล (biobutanol) ถูกคาดหวังว่าจะมีบทบาทสำคัญในยุคต่อไปของเชื้อเพลิงชีวภาพ บิวทานอล (1-butanol หรือ n-butanol) สามารถผสมรวมกับตัวทำละลายออร์แกนิกหลาย ๆ ชนิดที่ใช้กันโดยทั่วไป ส่วนใหญ่แล้วบิวทา

นอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ (ester derivative) แต่สามารถละลายได้ในน้ำประมาณ 70 กรัมต่อลิตร บิวทานอลเป็นสารเคมีที่สำคัญที่สามารถผลิตได้ประมาณ 5-10 ล้านตันในปัจจุบัน และคาดการณ์ในอนาคตว่าอัตราการผลิตบิวทานอลจะเพิ่มสูงขึ้น 3% ต่อปีใน 5 ปีข้างหน้า (Lee และคณะ, 2008a) ความสนใจในการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงทดแทนเช่นเดียวกับเอทานอลและไบโอดีเซลเกิดขึ้นเนื่องจากสามารถนำบิวทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวได้โดยตรงเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล เนื่องจากบิวทานอลมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่ดีกว่าในการที่จะนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ บิวทานอลไม่รวมกับน้ำจึงไม่มีคุณสมบัติการกัดกร่อนและมีค่าแรงดันระเหย (Vapor pressure) ต่ำกว่าในขณะที่ค่าพลังงานสูงกว่าถึงเกือบ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล นอกจากนี้ยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนทุกอัตราส่วนโดยปราศจากการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์และสามารถเคลื่อนย้ายและเก็บรักษาในระบบท่อและถังที่ใช้กับแก๊สโซลีนได้ (Gholizadeh, 2009)

2.3 การผลิตบิวทานอล

2.3.1 กระบวนการหมัก

การหมักเป็นที่รู้จักกันดีและทำกันมาตั้งแต่ก่อนประวัติศาสตร์ นานกว่าที่หลักการทางวิทยาศาสตร์จะเข้าใจ ชื่อของ ‘การหมัก’ ได้มาจากภาษาละตินคำว่า *fervere* ซึ่งหมายถึง ‘เดือด’ โดยลักษณะการเดือดเนื่องจากการผลิตฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีสาเหตุมาจากการย่อยสลายน้ำตาลที่มีอยู่ในสารสกัดในภาวะไร้ออกซิเจน การผลิตแอลกอฮอล์จากมอลต์หรือสารสกัดจากผลไม้ด้วยยีสต์เป็นกระบวนการทางอุตสาหกรรมแรกสุดสำหรับการผลิตสารเมทาบอไลท์และใช้เวลาหลายปีในการดำเนินการในระดับใหญ่ขึ้น (Stanbury และคณะ, 1995) ดังนั้นนักจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรมจึงอธิบายการหมักเพิ่มเติมว่าเป็นกระบวนการทั้งหมดรวมถึงการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักที่เป็นที่ยอมรับอาจจะแบ่งตามส่วนประกอบพื้นฐานได้ 6 แบบ ดังแสดงในภาพที่ 2.2

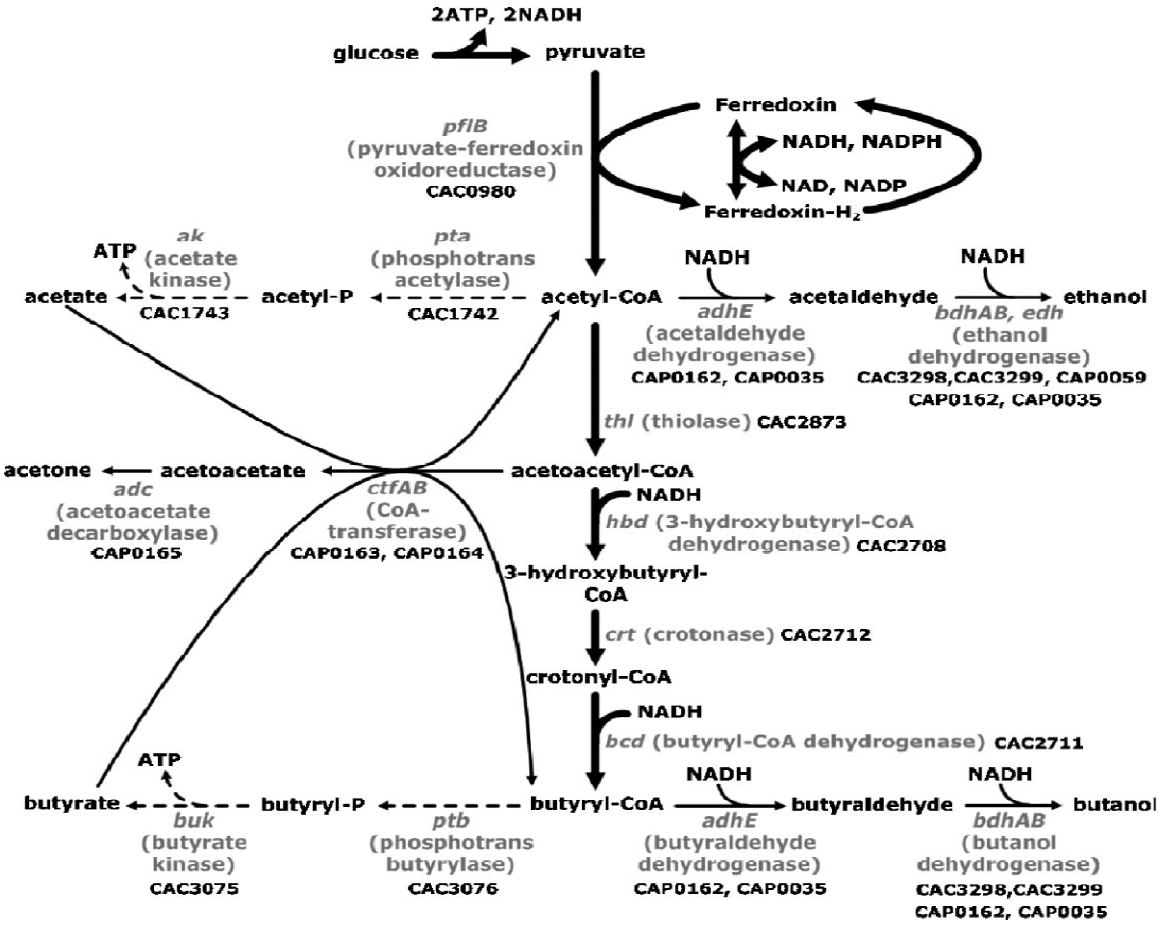


ภาพที่ 2.2 กระบวนการหลักในกระบวนการหมัก (Aleksic, 2009)

1. อาหารที่ใช้ในระหว่างการพัฒนาของกล้าเชื้อและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์
2. การฆ่าเชื้ออาหาร ถังปฏิกรณ์ชีวภาพและอุปกรณ์อื่นๆ
3. การผลิตเชื้อว่องไวบริสุทธิ์ที่มีปริมาณเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงในถังผลิต
4. การเจริญของจุลินทรีย์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลผลิต
5. การสกัดผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์
6. การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นในกระบวนการ

2.3.2 การหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล

การหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลเป็นกระบวนการที่ใช้ประโยชน์จากการหมักของจุลินทรีย์เพื่อผลิตอะซีโตน บิวทานอลและเอทานอลจากชีวมวล ซึ่งเป็นกระบวนการที่เป็นที่รู้จักกันดีและถูกใช้เป็นกระบวนการแรกในการผลิตอะซิโตนระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 ในภาวะไร้ออกซิเจนด้วยการเติมแก๊สไนโตรเจน สามารถผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลได้ในอัตราส่วน 3-6-1 (Aleksic, 2009) คุณสมบัติทั่วไปของกระบวนการหมักของ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่ผลิตตัวทำละลายแบ่งเป็น 2 ช่วง (Biphasic fermentation) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 ช่วงแรกเป็นช่วงของการสร้างกรด (Acidogenic phase) ระหว่างนี้จะมีการผลิตกรดเกิดขึ้น นอกจากนี้อะซิเตท บิวทิเรท ไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ยังเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ถูกผลิตขึ้นอีกด้วย โดยปกติแล้วช่วงของการสร้างกรดนี้จะเกิดขึ้นระหว่าง Exponential growth phase (Andersch และคณะ, 1983; Hartmanis และคณะ, 1984). และช่วงที่สองเป็นช่วงของการสร้างตัวทำละลาย (Solventogenic phase) ระหว่างนี้กรดจะถูกเปลี่ยนรูปใหม่อีกครั้งและถูกใช้ในการสร้างอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (Lee และคณะ, 2008a)



ภาพที่ 2.3. วิถีเมแทบอลิซึมใน *C. acetobutylicum* ปฏิกิริยาที่เป็นช่วงของการสร้างกรด (Acidogenic phase) และการสร้างตัวทำละลาย (Solventogenic phase) แสดงโดยลูกศรเส้นประและเส้นทึบ ตามลำดับ ลูกศรเส้นหนาแสดงปฏิกิริยาของกระบวนการหมักทั้งหมด ตัวอักษรสีเทาแสดงยีนและเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา CAC และ CAP numbers เป็น ORF numbers ในจีโนม (genome) และ mega plasmid ตามลำดับ (Lee และคณะ, 2008a)

2.3.3 อาหารสำหรับกระบวนการหมัก

การออกแบบอาหารสำหรับการหมักเป็นสิ่งสำคัญมาก ที่ขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินการเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการ ธัญพืชจากการเกษตรเป็นแหล่งของอาหารที่ดีสำหรับจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลจากธัญพืชได้ง่าย แต่การใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอาจส่งผลกระทบต่อราคาพืชอาหาร แนวคิดที่จะใช้ธัญพืชเป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์จึงเป็นหลักการที่ปฏิบัติในอดีต ในขณะที่การนำวัสดุจำพวกเซลลูโลสที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมที่แตกต่างกัน เป็นการใช้ประโยชน์จากของเสียที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพ แต่

ข้อเสียของวัสดุจำพวกเซลลูโลสนี้ คือ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสและมีความสามารถในการผลิตตัวทำละลายได้สูงในปัจจุบันมีน้อยมาก เทคนิคหลายประการถูกนำมาใช้ในการย่อยเซลลูโลสและปลดปล่อยกลูโคส แต่ค่าใช้จ่ายของเทคนิคเหล่านี้ยังคงเป็นปัญหา และเพื่อที่จะจัดการกับปัญหาเหล่านั้น นักจุลชีววิทยาใช้เทคนิคการดัดแปลงทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันในการพัฒนาแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถย่อยเซลลูโลสและผลิตบิวทานอลได้โดยตรง ในกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ทั้งหมดต้องการน้ำ แหล่งของพลังงาน คาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุและวิตามิน (Stanbury และคณะ, 1995) อาหารสำหรับการหมักที่ดีจะช่วยให้

1. ผลิตผลิตภัณฑ์หรือมวลชีวภาพต่อกรัมของสารตั้งต้นได้สูงสุด
2. ผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นสูงสุด
3. ทำให้อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด
4. ให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ
5. ทำให้เกิดปัญหาในระหว่างการเตรียมอาหารและการฆ่าเชื้อน้อยที่สุด
6. ทำให้เกิดปัญหาในด้านอื่น ๆ ของกระบวนการผลิต (การกวน การทำบริสุทธิ์และการบำบัดของเสีย) น้อยที่สุด

สิ่งที่สำคัญมากในสูตรอาหาร คือ ต้องพิจารณาราคาของวัสดุที่ใช้ โดยการใช้กากน้ำตาล แป้ง น้ำตาลกลูโคส ซูโครสและแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและเกลือแอมโมเนียม ยูเรีย ไนเตรท หรือ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนจะพบมากที่สุดเนื่องจากมีราคาถูก น้ำเป็นองค์ประกอบที่ใช้ในอาหารหมักที่สำคัญเช่นเดียวกับ ความร้อน ความเย็น การทำความสะอาดและการล้าง การนำน้ำกลับมาใช้ใหม่และประสิทธิภาพของน้ำมีความสำคัญสูง พลังงานที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตมาจากส่วนประกอบของอาหารหรือจากแสง จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็น chemo-organotrophs และแหล่งพลังงานพื้นฐาน คือ คาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนที่มีอยู่ในอาหาร การเลือกแหล่งคาร์บอนจะพิจารณาจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการและผลิตภัณฑ์หลักที่ผลิตเสมอ โดยทั่วไปในปัจจุบันจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ในอาหารเป็นอีกหนึ่งสิ่งสำคัญ เนื่องจากมีรายงานว่าอัตราของแหล่งคาร์บอนที่จะถูกในกระบวนการเมแทบอลิซึม มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักใช้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้สารอินทรีย์และอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ทั้งคู่ แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์อาจจะเป็นแก๊สแอมโมเนีย แอมโมเนียม เกลือหรือไนเตรต

แอมโมเนียมักใช้สำหรับควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักและเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์อาจจะเป็นโปรตีน กรดอะมิโน หรือยูเรีย จุลินทรีย์ทั้งหมดต้องการแร่ธาตุบางอย่างสำหรับการเจริญเติบโตและการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ในอาหารส่วนใหญ่แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม กำมะถันและคลอรีนเป็นส่วนประกอบที่จำเป็น (Aleksic, 2009)

2.3.4 ออกซิเจน

O' Brien และ Mortis (1971) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของ *C. acetobutylicum* พบว่าการมีเซลล์สัมผัสกับออกซิเจนในช่วงเวลาสั้น ๆ ไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่ถ้าเซลล์สัมผัสกับออกซิเจนความเข้มข้นสูงจะทำให้อัตราการบริโภคน้ำตาลลดลงและการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) กรดไรโบนิวคลีอิกและโปรตีนจะหยุดลง ภายใต้ภาวะใช้ออกซิเจน (aerobic conditions) ผลกระทบจากการยับยั้งของออกซิเจนจะคืนสภาพอย่างรวดเร็วและการเจริญเติบโตและการเผาผลาญอาหารจะกลับมาทำงานปกติเมื่อเซลล์กลับเข้าสู่ภาวะไร้ออกซิเจน ผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นว่าการสัมผัสกับออกซิเจนของจุลินทรีย์ยังส่งผลให้มีการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นในระดับของการเพิ่มการสร้างสปอร์ได้รับผลกระทบจากสภาวะของจุลินทรีย์อายุของเซลล์และระยะเวลาของการสัมผัสกับออกซิเจน มีการรายงานว่าการสัมผัสกับออกซิเจนช่วงสั้น ๆ ระหว่าง 2 และ 3 นาทีทุก 1 ถึง 2 ชั่วโมงเพิ่มผลผลิตของบิวทานอลได้ถึง 3.1-9.1 เปอร์เซนต์

2.3.5 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหลักต่อผลของการหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล การผลิตตัวทำละลายในระดับอุตสาหกรรมระบุว่าการเริ่มต้นของการผลิตตัวทำละลายจะเกิดขึ้นหลังจากที่ค่าความเป็นกรดด่างของส่วนผสมลดลงอยู่ที่ประมาณ 4.5-5.0 จุลินทรีย์ที่ถูกเลี้ยงในค่าความเป็นกรดด่างสูงจะผลิตกรดเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่ถูกเลี้ยงในค่าความเป็นกรดด่างต่ำจะผลิตตัวทำละลาย (Nishio และคณะ, 1983) แต่อย่างไรก็ตามช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้สำหรับการผลิตตัวทำละลายอาจจะค่อนข้างแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะของจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* DSM1732 ผลิตตัวทำละลายได้เมื่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.0 เท่านั้น (Andersch และคณะ, 1983) ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ที่ผลิตตัวทำละลายเหล่านี้อยู่ที่ประมาณ 4.3 และตัวทำละลายอาจยังคงมีการผลิตที่ค่าความเป็นกรด

ด่างต่ำถึง 3.8 ได้ *C. acetobutylicum* ATCC824 สามารถผลิตตัวทำละลายในระดับที่ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 4.3 และ 5.5 ในขณะที่ช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลายสำหรับ *C. acetobutylicum* P262 P265 และ P270 คือ 4.5 ในอุตสาหกรรมการหมักค่าความเป็นกรดด่างของอาหารหมักอยู่ที่ 6.0 และในระยะแรกของการหมักเมื่อถึงจุด breakpoint ค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงอยู่ที่ประมาณ 5.2 หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 5.8 เมื่อสิ้นสุดการหมัก การศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าสายพันธุ์เหล่านี้สามารถผลิตตัวทำละลายได้ดีเมื่อค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่างที่ 5.0-6.5 ในขณะที่ *C. beijerinckii* VPI13436 ผลิตตัวทำละลายเมื่อค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 6.8 (George และ Chen, 1983) ค่าความเป็นกรดด่างต่ำจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์กรดที่เพิ่มขึ้น การเพิ่มจำนวนเซลล์และลดการผลิตไฮโดรเจนและอัตราการเจริญเติบโตที่เฉพาะเจาะจง (Jones และ Woods, 1986)

2.3.6 ความเป็นพิษของตัวทำละลาย

หนึ่งในปัญหาที่สำคัญที่สุดในการหมักอะซีโตน บิวทานอลและเอทานอล คือ ความเป็นพิษของตัวทำละลาย เมแทบอลิซึมของเซลล์ของ *Clostridium* สิ้นสุดลงเมื่อมีตัวทำละลายมีความเข้มข้นถึง 20 กรัมต่อลิตรหรือมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 2008a) เมื่อตัวทำละลายมีความเข้มข้นสูงจะไปจำกัดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่นำไปใช้สำหรับการหมัก ส่งผลให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายและการผลิตสุดท้ายต่ำสุด บิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีพิษร้ายแรงกว่าตัวอื่น ๆ โดยจะไปขัดขวางองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นฟอสโฟลิปิด ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการไหลภายในเมมเบรน (Bowles และ Ellefson, 1985) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสภาพขาดสมดุลและไม่อาจดำรงชีพได้ในที่สุด

2.4 ลักษณะสายพันธุ์ที่ผลิตบิวทานอล

Individual vegetative cells ของแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* มีรูปร่างแท่งตรงขนาดอยู่ในช่วง 0.5–1.5×1.5–6 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2.4ก) เมื่อเชื้ออยู่ในช่วงของการเจริญจะติดสีย้อมแกรมบวก โดยปกติออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์อย่างรุนแรง สามารถผลิตผลิตภัณฑ์จากการหมักได้มากกว่า 1 ชนิด (heterofermentative) สามารถสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ระหว่างการสร้างสปอร์ เซลล์จะบวมอย่างเห็นได้ชัดและเก็บแกรนูลซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานระหว่างกระบวนการสร้างตัวทำละลาย สปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์ (sub-terminal) (ภาพที่ 2.4ข) อุณหภูมิที่

เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส โดยปกติแล้วเชื้อต้องการ biotin และ 4-aminobenzoate ซึ่งเป็นวิตามินส่งเสริมการเจริญ เชื้อ *Clostridium* spp. สายพันธุ์ที่ผลิต ABE โดยทั่วไปแบ่งออกได้ 4 กลุ่มอย่างชัดเจนตามลักษณะทางชีวเคมีและพันธุกรรม (Woods, 1995) แต่กลุ่มที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ กลุ่มที่เจริญในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียม (mesophiles) คือ *C. acetobutylicum* และ *C. beijerinckii* (หรือที่รู้กันกันในชื่อ *C. butylicum)* และเป็นหนึ่งในสายพันธ์ที่มีการศึกษาการหมัก ABE มากที่สุด (Karakashev และคณะ, 2007)

(ก) (ข)

ภาพที่ 2.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Micrographs, SEM) ของ *C. acetobutylicum* (หรือ “*Weizmann organism*”) แสดงระยะที่แตกต่างกันของการสร้างสปอร์โดยภาพ (ก) vegetative cells ภาพ (ข) เซลล์ในรูปสปอร์

สายพันธุ์แรก คือ *C. acetobutylicum* ATCC824 ถูกคัดแยกครั้งแรกในปี 1924 จากดินในสวนในรัฐ Connecticut (Weyer และ Rettger, 1927) และเป็น *Clostridium* ผลิตตัวทำละลาย ABE ที่มีการศึกษามากที่สุดตัวหนึ่งร่วมกับ *C. beijerinckii* NCIMB8052 มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกลุ่มของ *Clostridium* ที่ผลิตตัวทำละลาย (Cornillot และ Soucaille, 1996) และสายพันธุ์ ATCC824 แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ “Weizmann strain” โดยสายพันธุ์ ATCC824 ดั้งเดิมมีลักษณะเฉพาะทางสรีรวิทยาและใช้ศึกษาอย่างหลากหลายทั้งในด้านชีววิทยาโมเลกุลและดัดแปลงวิถีเมแทบอลิซึมในยุโรปและสหรัฐฯ (Girbal และ Soucaille, 1998; Papoutsakis และ Bennett, 1999) การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ 16s rRNA gene ของตัวแทนหลายสายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าอะไมโลไลติก *C. acetobutylicum* ATCC824 เป็นช่วงการวิวัฒนาการจากสายพันธุ์แซคคาโรไลติก (saccharolytic strains) รวมถึง *C. beijerinckii* NCIMB8052 หลายรายงานเสนอว่า *C. beijerinckii* อาจมีความเป็นไปได้สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตตัวทำละลายดีกว่า *C. acetobutylicum* เนื่องจากมีขอบเขตของสารตั้งต้นที่กว้างขึ้นและค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างตัวทำละลาย (Ezeji และคณะ, 2004)

เป็นที่รู้กันดีว่าสายพันธุ์ ATCC824 ดั้งเดิมใช้โมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ แป้งและสารตั้งต้นอื่นๆ เช่น อินูลิน เพกติน หางนมและไซแลนแต่ไม่ใช่เซลลูโลสที่ตกผลึกเป็นแหล่งคาร์บอน (Lee และคณะ, 1985; Mitchell, 1998)

2.5 เศรษฐศาสตร์ของการหมักอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล

บริษัทไบโอเทคโนโลยีหลายบริษัท เช่น ButylFuel, Cathay Industrial Biotech, Cobalt Biofuels, Green Biologics, Metabolic Explorer, Tetravitae Bioscience และอีกหลายแห่งทั่วโลกทุ่มเทให้กับการค้นคว้าคัดเลือก พัฒนาสายพันธุ์ กระบวนการหมักเชื้อและการผลิต ABE อย่างมีประสิทธิภาพในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันกระบวนการหมัก ABE ในโรงงานบางแห่ง คือ ประเทศจีนและบราซิลในระดับอุตสาหกรรมสามารถดำเนินการได้จริง กระบวนการผลิต ABE ในยุโรป อเมริกา รัสเซีย เป็นต้น ได้มีการถกเถียงอภิปรายมากมาย (Zverlov และคณะ, 2006; Karakashev และคณะ, 2007; Ezeji และคณะ, 2007; Dürre, 2008; Lee และคณะ, 2008b) ในปี 1996 การผลิตบิวทานอลประจำปีทั่วโลกอยู่ที่ 2.49×10^6 ตัน (Lee และคณะ, 2008a) คาดการณ์ว่าบิวทานอลประมาณ 10-12 ล้านปอนด์จะถูกผลิตขึ้นทุกปี จะมีมูลค่า 7-8.4 ล้านดอลลาห์สหรัฐฯ สำหรับราคาในปัจจุบัน โครงการทางการตลาดของบิวทานอลมีการขยายออก 3% ทุกปี การผลิตบิวทานอลในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การผลิตบิวทานอลในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก (Qureshi และ Blaschek, 2001)

ภูมิภาค	บิวทานอล (กก.)
อเมริกาเหนือ	1.17×10^9
สหรัฐอเมริกา	1.17×10^9
อเมริกาใต้	5.12×10^7
ยุโรป	8.43×10^8
เอเชีย	4.30×10^8
รวม	2.49×10^9

เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาเศรษฐศาสตร์หลายด้านที่ชักนำให้มีการผลิตบิวทานอลจากสารตั้งต้นหลายแหล่งและกระบวนการที่ออกแบบ (Lenz และ Moreira, 1980; Qureshi และ Blaschek, 2001) การนำบิวทานอลกลับคืนจากอาหารที่ใช้หมักโดยการกลั่นเป็นสิ่งที่สิ้นเปลืองเมื่อเปรียบเทียบกับบิวทานอลที่ได้จากปิโตรเคมี อย่างไรก็ตามการศึกษา *C. beijerinckii* BA101, *C. acetobutylicum* P260, hydrolyzed DDGS ในการหมักและฟางข้าวสาลีบอกให้รู้ว่าการผลิตไบโอบิวทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อการค้าใกล้เข้ามาแล้ว (Ezeji และคณะ, 2007) ตัวอย่างเช่น DuPont (สหรัฐอเมริกา) และ British Petroleum/BP (อังกฤษ) ได้จัดตั้งทีมงานพัฒนา 1-butanol ในทางการค้าให้มีค่าออกเทนเท่ากับไอโซเมอร์อื่นของไบโอบิวทานอล ทั้งสองบริษัทยังได้แสดงให้เห็นถึงการทดสอบข้อดีของเชื้อเพลิงชีวภาพว่าการใช้ไบโอบิวทานอลสามารถเพิ่มการผสมของเชื้อเพลิงชีวภาพกับแก๊สโซลีนมากกว่าเอทานอลที่จำกัดอยู่ที่ 10% โดยไม่มีการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ คาดกันว่าโรงงานแรกมุ่งเน้นที่น้ำตาล แป้งข้าวโพดหรือสารประกอบที่ได้ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนแทนเนื่องจากมีปริมาณมาก (Ezeji และคณะ, 2007) ความก้าวหน้าหลายอย่างได้รับการดำเนินการรวมถึงการพัฒนาและการเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมและการพัฒนาสูตรอาหาร เทคโนโลยีของกระบวนการและใช้ของเสียเป็นสารตั้งต้น แต่การผลิตบิวทานอลจะต้องได้รับการเปลี่ยนเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีและกระบวนการที่สามารถแข่งขันได้โดยตรงกับปิโตรเคมี ตัวอย่างเช่นการศึกษาขั้นต้นที่มุ่งเน้นไปที่การใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ราคาถูกจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นวัตถุดิบตั้งต้น รวมถึงน้ำเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม (Hipolito และคณะ, 2008), corn steep medium (Parekh และ Blaschek, 1999), กากน้ำตาล (ผลิตภัณฑ์รองของอุตสาหกรรมน้ำตาล) (Syed และคณะ, 2008), corn fiber hydrolysate (Qureshi และคณะ, 2008), degermed corn (Campos และคณะ, 2002; Ezeji และคณะ, 2007), กากถั่วเหลือง wheat straw hydrolysate (Qureshi และคณะ, 2007 และ Qureshi และคณะ, 2008), wheat straw hydrolysate, มันฝรั่งทั้งหมด และ hemicelulose hydrolysate จากไม้และ อุตสาหกรรมกระดาษ (Mes - Hartree และ Saddler, 1982) ซึ่งคาดว่าการวิจัยในอนาคตอาจจะมุ่งเน้นการพัฒนา second-generation cultures (เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่มีอยู่ของ *C. beijerinckii* BA101, *C. acetobutylicum* PJC4BK และ *C. acetobutylicum* P260 ที่ผลิตรวมตัวทำละลายอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลสูงถึง 25-33 กรัมต่อลิตร (Qureshi และ Blaschek, ปี 2005; Ezeji และคณะ, 2006) ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีอีกอย่างหนึ่งรวมถึงการนำผลพลอยได้ (by-products) กลับมาใช้ใหม่ (น้ำเสีย มวลเซลล์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน) สำหรับเพิ่มรายได้ ตัวอย่างเช่น แก๊ส

คาร์บอนไดออกไซด์สามารถนำกลับเข้าไปในสาหร่ายและเปลี่ยนเป็นน้ำมันเมื่อถูกแสงแดด การใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะได้รับประโยชน์จากอุตสาหกรรมการผลิตไบโอบิวทานอลค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นต้นทุนการผลิตที่เป็นศูนย์ นอกจากนี้แก๊สไฮโดรเจนสามารถแยกและเผาไหม้ได้ในการผลิตไฟฟ้า (Ezeji และคณะ, 2007).

ปัจจุบันมีบริษัทน้ำมันหลายบริษัทที่สนใจและลงทุนในโครงการการผลิตบิวทานอลจากมวลชีวภาพที่ไม่มีสิ้นสุด หากดูแล้วบริษัทที่สนใจอย่างยิ่งต่อการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ คือ BP และ DuPont ซึ่งมีความร่วมมือกับหลายองค์กรทางการวิจัยและการศึกษาในการพัฒนาและผลิตไบโอบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมในปี 2006 และเสนอโครงการให้มีการผลิตไบโอบิวทานอล 30,000 ตันต่อปีในโรงงานผลิตเอทานอลของ British sugar ในประเทศอังกฤษ ผลจากการทดสอบจาก BP และ DuPont ในปี 2008 แสดงให้เห็นว่าการใช้ไบโอบิวทานอลสามารถเพิ่มการผสมระหว่างเชื้อเพลิงชีวภาพในแก๊สโซลีนมากกว่า 10% ที่ใช้ในการผสมระหว่างเอทานอลโดยปราศจากการปรับแต่งเครื่องยนต์ (Gholizadeh, 2009)

2.6 ประโยชน์จากบิวทานอล

นอกจากการนำบิวทานอลมาเป็นเชื้อเพลิงเหลวใช้กับเครื่องยนต์แล้ว บิวทานอลยังมีความสำคัญทางเคมีในหลายอุตสาหกรรม เกือบครึ่งหนึ่งของการผลิตบิวทานอลทั่วโลกถูกใช้ในรูปของ butyl acrylate และ methacrylate ester สารทั้งสองต่างใช้ในการผลิต latex surface coatings, enamels, nitrocellulose lacquers, fibers และ plastics เป็นต้น นอกจากนี้แล้ว สารประกอบจากบิวทานอลที่สำคัญ คือ butyl glycol ether, butyl acetate และ plasticizers รองลงมา คือ butyl amines และ amino resins บิวทานอลและสารประกอบที่ได้จากบิวทานอลเป็นสารที่ทำให้เกิดการเจือจางใน paint thinners, hydraulic ตัวทำละลายสีและ brake fluid formulations นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมน้ำหอมและเป็นส่วนสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ วิตามินและฮอร์โมน การใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ของบิวทานอลรวมถึงอุตสาหกรรม safety glass, detergents, flotation aids เช่น butyl xanthate อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สารตกแต่งตา ยาทาเล็บ ผลิตภัณฑ์สำหรับการโกนหนวดและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขอนามัย นอกจากนี้ยังเป็นสารสำหรับการสกัดในอุตสาหกรรมอาหาร (baking finish) และกลิ่น (Lee และคณะ, 2008b; Dürre, 2008) ไบโอบิวทานอลเป็นบิวทานอลที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นและกระบวนการผลิตทางชีวภาพและสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหลวในเครื่องยนต์ได้ในอนาคต ถึงแม้ว่าเอทานอลจะเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่นิยมในปัจจุบันด้วยเหตุหลาย

ประการ (Hansen และคณะ, 2005; Niven, 2005) อย่างไรก็ตามบิวทานอลอาจเป็นสารที่มีข้อดีกว่าหลายประการ เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางฟิสิกส์และคุณสมบัติทางเคมีเปรียบเทียบกับ เอทานอล (Huber และคณะ, 2006) พบว่ามีคุณสมบัติทางค่าพลังงานที่ดีกว่าเอทานอล กล่าวคือ ไบโอบิวทานอลมีคุณสมบัติด้านพลังงานที่ใกล้เคียงกับแก๊สโซลีนมากกว่าไบโอเอทานอล โดยในปริมาณที่เท่ากันเครื่องยนต์จะใช้เอทานอลหมดเร็วกว่าบิวทานอล นอกจากนี้บิวทานอลยังสามารถผสมกับแก๊สโซลีนโดยทั่วไปในอัตราผสมใดก็ได้ (Atsumi และคณะ, 2008) และไม่ต้องมีการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ มีรายงานการทดลองใช้บิวทานอลเติมแทนแก๊สโซลีน พบว่าเครื่องยนต์ทำงานได้ตามปกติ เครื่องยนต์มีการใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีน 9% ถึงแม้ว่ารถยนต์ใช้บิวทานอลสูงกว่าแก๊สโซลีน แต่พบว่าการใช้ไบโอบิวทานอลมีการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ไฮโดรคาร์บอนและการปล่อยสารพิษ ไนตริกออกไซด์และไนโตรเจนไดออกไซด์ลดลงมาก ซึ่งเป็นเรื่องสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมของโลก ข้อได้เปรียบอื่นของการใช้บิวทานอลที่มากกว่าเอทานอล คือ

1. การระเหย (Volatility) ต่ำกว่าจึงเป็นพิษน้อยกว่า เนื่องจากมีค่า Reid Vapor Pressure (RVP) ต่ำกว่าเอทานอล 7.5 เท่า (Szulczyk, 2010)
2. บิวทานอลไม่ดูดซับความชื้นจึงมีค่า Hygroscopicity ต่ำกว่า ดังนั้นบิวทานอลจึงได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่ำกว่า (Gholizadeh, 2009)
3. บิวทานอลมีค่าการกัดกร่อนต่ำกว่า (Dürre, 2007)
4. การใช้บิวทานอลปลอดภัยกว่าเอทานอลเนื่องจากมีค่าการติดไฟ (Flash point) สูงกว่าและมีค่าความดันไอต่ำกว่า (Gholizadeh, 2009)
5. บิวทานอลมีค่าออกเทนต่ำกว่าเอทานอล (Szulczyk, 2010)
6. บิวทานอลมีค่าพลังงานสะสมต่อแกลลอนสูงกว่าเอทานอลประมาณ 30% โดยบิวทานอลมีค่า 110,000 BTU ต่อแกลลอน ในขณะที่เอทานอลมีค่า 84,000 BTU ต่อแกลลอน (Aleksic, 2009)
7. สามารถผสมรวมกันทั้งแก๊สโซลีนและดีเซลได้สมบูรณ์มากกว่าเอทานอล (Park และคณะ, 1989)

ดังนั้นจึงทำให้การใช้บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงมีความสะดวกและประหยัดค่าขนส่ง เนื่องจากสามารถขนส่งผ่านท่อได้และสามารถใช้อุปกรณ์ที่ใช้ในสถานีเติมน้ำมันและรถยนต์ได้ โดยไม่ต้องปรับเปลี่ยนใด ๆ เลย ในขณะที่การผสมเอทานอลให้อยู่ในระบบต้องทำในช่วงเวลาสั้น ๆ จึงเหมาะสมและไม่กระทบต่อระบบการเก็บและการเติมเชื้อเพลิงเหลวเหล่านี้ การที่ค่าความดันไอ (Vapor pressure) ของบิวทานอลมีค่าเท่ากับ 4 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าเอทานอลที่มีค่าเป็น 45 มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียสอยู่ 11 เท่า (Gholizadeh, 2009) ทำให้สามารถเติมโดยตรงกับแก๊สโซลีนโดยไม่เกิดการสูญเสียจากการระเหยจึงไม่มีผลกระทบข้างเคียง เมื่อเปรียบเทียบการผสมเชื้อเพลิงชีวภาพอื่น ๆ กับแก๊สโซลีนแล้วพบว่าจากคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของบิวทานอลทำให้สะดวกต่อการผสมกับแก๊สโซลีนโดยไม่มีการแยกชั้นถึงแม้มีน้ำปนอยู่ด้วยก็ตาม (เนื่องจากมีการปนของน้ำโดยตรงน้อยมาก) อย่างไรก็ตามบิวทานอลมีความความหนืดต่ำเป็น 2 เท่าของเอทานอลและเป็น 5-7 เท่าของแก๊สโซลีน (Wackett, 2008) คุณสมบัติอื่น ๆ ทางฟิสิกส์ของบิวทานอล เช่น ความหนาแน่นและค่าความจุความร้อนใกล้เคียงกับเอทานอล

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Calam (1980) อธิบายการคัดแยกแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* จากถั่วปากอ้า มันฝรั่งหรือข้าวโพด ไอโซเลทที่คัดแยกได้นำมาทดสอบในอาหารที่มีกากน้ำตาลและผลผลิตที่ได้ คือ บิวทานอลรวมกับอะซิโตน 18-20 กรัมต่อลิตร จากแบคทีเรียที่แยกได้จากมันฝรั่ง รากถั่วและเมล็ดข้าวโพดหัก ซึ่งผลเหล่านี้ได้เป็นผลจากตัวอย่างในสหราชอาณาจักร ในขณะที่ประเทศอื่น ๆ สามารถใช้วิธีการเดียวกันได้ เช่น ปลูกถั่วในดินที่แตกต่างกันหรือโดยการทดสอบกับข้าวโพด แต่มันอาจจะขึ้นอยู่กับมูลค่าทางเศรษฐกิจในขณะทำการทดลอง ในขณะเดียวกันการตรวจสอบอย่างละเอียดของสายพันธุ์ที่แยกก็ได้เป็นสิ่งที่จำเป็น การตรวจสอบทำโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography) ซึ่งต้องแยกบางสายพันธุ์ที่อาจจะพบการผลิตไอโซโพรพานอล (Iso–propanol) ออก

Lin และ Blaschek (1983) ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาสายพันธุ์กลายที่ผลิตบิวทานอลจาก *Clostridium acetobutylicum* และศึกษาลักษณะการหมัก Extruded corn ในการหมักแบบกะเพื่อตรวจสอบว่าการหมักบิวทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการทำเจือจางอนุพันธ์ของ *C. acetobutylicum* ATCC824 ป้องกันการเจริญของสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยที่สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีบิวทานอล 15 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ สายพันธุ์กลาย SA-1 ยัง

สามารถเจริญได้ที่อัตรา 66% ของชุดควบคุมที่ไม่ถูกยับยั้ง สายพันธุ์ SA-1 ผลิตบิวทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (จาก 5-14%) และอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่ำ (12.5-40%) กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมใน Extruded corn broth (ECB) 4-20%

Jones และ Woods (1986) ทำการแยก *Clostridium* สายพันธุ์ที่ผลิตตัวทำละลายถูกพิสูจน์โดยการเปรียบเทียบอย่างง่ายกับการสร้างสปอร์ (Spore formers) และไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Obligate anaerobes) ซึ่งสัมพันธ์กับความต้องการในการเจริญเติบโตพื้นฐานและวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกได้รับการบันทึกเป็นอย่างดี มีการตรวจพบว่าโดยทั่วไปแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับพืชที่มีชีวิตมากกว่าพืชที่ผุพังหรือดิน การเลือกสายพันธุ์เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักขึ้นอยู่กับลักษณะของวัตถุดิบที่ใช้ อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการ ความต้องการสารอาหารเพิ่มเติมและความต้านทานต่อฟาจ (Phage) จำนวนชนิดที่แตกต่างกันของ Clostridia ผลิตบิวทานอลที่ได้รับการยอมรับในปัจจุบันขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดและสัดส่วนของตัวทำละลายที่ผลิต *C. beijerinckii (C. butylicum)* ผลิตตัวทำละลายในอัตราส่วนเดียวกับ *C. acetobutylicum* แต่ผลิตไอโซโพรพานอล (Isopropanol) แทนอะซิโตน ในขณะที่ *C. aurantibutyricum* นอกจากบิวทานอลแล้วยังผลิตทั้งอะซิโตนและไอโซโพรพานอล (Isopropanol) *C. tetanomorphum* เป็นชนิดที่แยกได้ใหม่ซึ่งผลิตบิวทานอลและเอทานอลได้ปริมาณเกือบเท่ากัน แต่ไม่มีการผลิตตัวทำละลายอื่น

Sukhumavasi และคณะ (1988) อธิบายถึงการแยกแบคทีเรียที่เจริญในภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิปานกลาง สร้างสปอร์ ย่อยเซลลูโลสจากปุ๋ยหมักในประเทศไทย เซลล์ของแบคทีเรียนี้ย้อมติดสีแกรมบวก แต่เข้าสู่ช่วง Stationary phase จะติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนไม่เคลื่อนที่และสร้างสปอร์รูปไข่บริเวณปลายเซลล์ (Terminal oval spores) ทำให้เซลล์พอง เมื่อดูโคโลนีใกล้ ๆ จะมีรูปร่างคล้ายกระสวยสีเหลืองขาว โดยมีแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่หลากหลาย เช่น เซลโลไบโอส Esculin และไซโลส เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญเติบโต และมีการผลิตเอทานอล อะซิเตท บิวทิเรท ไฮโดรเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเจริญในอาหารที่มีเซลลูโลสหรือเซลโลไบโอส สามารถไฮโดรไลซ์เซลลูโลสที่เป็นผลึก ฟางข้าวและวัสดุเซลลูโลสอื่น ๆ ได้โดยไม่ต้อง ผ่านการปรับสภาพทางเคมีใด ๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่มีชื่อว่า *Clostridium josui*

Afschar และคณะ (1990) พัฒนากระบวนการหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) ด้วยคาร์โบไฮเดรตผสม โดยความร่วมมือกับบริษัท Copersucar ของประเทศบราซิล ที่พัฒนาหลายตัวแปรของระบบการหมักสำหรับการผลิตบิวทานอลและอะซิโตนอย่างต่อเนื่องจาก

กากน้ำตาล ระบบการหมักเหล่านี้เกี่ยวข้องกับเศรษฐกิจที่ต้องการการลงทุนน้อย โดยใช้เชื้อที่เลี้ยงอย่างต่อเนื่องเป็นกล้าเชื้อที่ดีพอ ๆ กับการหมักแบบต่อเนื่องสองขั้นตอนด้วยการรีไซเคิลเซลล์ (cell recycling) ตัวอย่างเช่น อะซิโตนและบิวทานอล 13.3 กรัมต่อลิตร ถูกผลิตด้วย 3.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยการหมักกากน้ำตาลแบบต่อเนื่องสองขั้นด้วยการรีไซเคิลเซลล์ (cell recycling) การผลิตอะซิโตนบิวทานอลจากกากน้ำตาลจัดเป็นเศรษฐกิจในบราซิลและมีการวางแผนการผลิตในระดับใหญ่ขึ้น

Quratulain และคณะ (1995) รายงานการพัฒนาสายพันธุ์ทนบิวทานอลจาก *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยศึกษาผลการยับยั้งของบิวทานอลต่อการเจริญเติบโตและการหมักกากน้ำตาลเพื่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลของ *C. acetobutylicum* ทั้งในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทนบิวทานอล 20 ไอโซเลทคัดแยกจากตัวอย่างดินปลูกมันฝรั่งที่แตกหัว หลังจากที่การบ่งชี้และคัดแยกมีเพียง 5 สายพันธุ์ที่ทดสอบการผลิตตัวทำละลายในฟลาสก์ขนาด 3 ลิตรในอาหารที่มีกากน้ำตาล การผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยของ *C. acetobutylicum* สายพันธุ์ดั้งเดิมถูกจำกัดโดยความเป็นพิษของบิวทานอลที่ 1.6 โมลต่อลิตร ความทนบิวทานอลเพิ่มขึ้นถึง 4.8 โมลต่อลิตรโดยวิธีการ serial enrichment method สายพันธุ์ทนบิวทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้นสำหรับการเปลี่ยน Saccharides เป็นตัวทำละลายผสมและผลิตบิวทานอลมากขึ้น 52% ที่สูญเสียอะซิโตนและเอทานอลมากกว่าสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้ข้อมูลการหมักของสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ทนบิวทานอลในการหมักแบบไร้ออกซิเจนของกากน้ำตาลแสดงให้เห็นถึงลักษณะที่ดีกว่าในแง่ของอัตราการเจริญ เวลาในการเริ่มผลิตบิวทานอล การใช้น้ำตาล ความเข้มข้นสุดท้ายของบิวทานอลและพารามิเตอร์อื่น ๆ

Montoya และคณะ (2000) อธิบายการแยก Clostridia ตามธรรมชาติจากประเทศโคลัมเบีย การกระจายที่แตกต่างกันในพืชและดินและศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้ ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียผลิตบิวทานอล อะซิโตนได้ 178 ไอโซเลทและมีการประเมินศักยภาพในการหมัก พบว่า 13 ไอโซเลทผลิตตัวทำละลายทั้งหมดจากน้ำตาลกลูโคสมากกว่า *C. acetobutylicum* ATCC824 ไอโซเลทที่แยกได้ถูกบ่งชี้ด้วยลักษณะทางจุลชีววิทยาและยืนยันด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา แมโครและไมโครโพลีมอฟิซึม (macro- and micropolymorphism) ว่าเป็น genus *Clostridium* ในขณะที่ไอโซเลทที่ผลิตตัวทำละลายสูงที่สุดคือ IBUN 125C และ IBUN 18A โดยผลิตบิวทานอล 0.46 โมล และเอทานอล 0.96 โมลจากกลูโคส 1 โมล ผลผลิต 25.2 และ 29.1 กรัมต่อลิตรของตัวทำละลายทั้งหมดตามลำดับซึ่งใกล้เคียง

กับค่าสูงสุด จากข้อมูลทางสรีรวิทยาของไอโซเลทที่ผลิตตัวทำละลายสามารถจัดว่าเป็นสายพันธุ์ของ *C. acetobutylicum, C. beijerinckii* และ *Clostridium* NCP262

Qureshi และ Blaschek (2000) ศึกษาการประเมินค่าใช้จ่ายในการผลิตบิวทานอลจากข้าวโพดเมื่อใช้สายพันธุ์กลาย *C. beijerinckii* BA101 ที่พัฒนาจาก *C. beijerinckii* NCIMB 8052 ทำให้ผลิตบิวทานอลปริมาณมาก (Hyper–butanol) ร่วมกับอาหารที่ใช้หมักและกระบวนการที่พัฒนาขึ้นใหม่ในเชิงพาณิชย์ โดยผลิตบิวทานอลในเครื่องปฏิกรณ์แบบกะ (Batch reactors) และคืนสภาพ (recovered) โดยการกลั่น ได้ผลผลิต คือ อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) รวม 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่การผลิตบิวทานอลโดยการหมักหยุดชะงักลงเนื่องจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเมื่อตัวทำละลายรวม (อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล, ABE) มีความเข้มข้นสูงสุดที่ 20 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ *C. acetobutylicum* หรือ *C. beijerinckii* ในขณะที่ *C. beijerinckii* BA101 สามารถผลิตบิวทานอลได้ 23 กรัมต่อลิตร และทนตัวทำละลายรวมได้ 33 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 69% ที่ผลิตตัวทำละลายรวมเพียง 15-20 กรัมต่อลิตร

Sánchez และ Cardona (2008) วิเคราะห์แนวโน้มที่แตกต่างกันในการผลิตเอทานอลซึ่งคำนึงถึงความสมบูรณ์ การพัฒนาเทคโนโลยี ความสำคัญของวัตถุดิบที่แตกต่างกันจากเอทานอลที่ได้และความเป็นไปได้ในการใช้วัตถุดิบทางเลือกที่จะนำไปสู่การปรับปรุงกระบวนการทั่วโลก โดยพบว่าวัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอล คือ อ้อยทั้งในรูปแบบของน้ำอ้อยหรือกากน้ำตาล (ผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาล) ประมาณร้อยละ 79 ของเอทานอลในประเทศบราซิลที่ผลิตจากน้ำอ้อยสดและที่เหลือร้อยละ 21 จากกากน้ำตาล จุลินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องมาจากความสามารถในการไฮโดรไลซ์น้ำตาลอ้อยเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่ง่ายต่อการนำไปใช้ นอกจากนี้ยังพบว่าผลผลิตเอทานอลประจำปีจากแต่ละเฮคเตอร์ (hectare) ของข้าวโพดต่ำกว่าอ้อย โดยทั่วไปแล้วการใช้วัสดุที่มีน้ำตาลซูโครสตัวอย่างเช่นกากน้ำตาลผลิตเอทานอลช่วยให้มีต้นทุนต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับวัสดุจำพวกแป้ง (ส่วนของเมล็ดเป็นส่วนใหญ่)

Aleksic (2009) ศึกษาการผลิตและตรวจสอบศักยภาพของบิวทานอลจากแบคทีเรีย *Clostridium beijerinckii* ATCC35702 กระบวนการหมักดำเนินการในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ BIOFLO 110 ขนาด 7 ลิตร ในสภาวะที่มีแก๊สไนโตรเจน 85% แก๊สไฮโดรเจน 5% และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 10% ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิดรวมทั้ง corn syrup เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ การผลิตบิวทานอลขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการ รวมทั้งอาหาร

ที่เลี้ยง สารตั้งต้นสำหรับการหมักแบบอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) ดั้งเดิมคือ แป้งหรือกากน้ำตาล อย่างไรก็ตามมีการแนะนำสารตั้งต้นใหม่ที่จะนำไปใช้ในการผลิตรวมถึงแก่นตะวัน (*Jerusalem artichokes*) ที่จะต้องมีการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์และหางนม (Cheese whay) ที่ต้องการการปรับสภาพก่อนที่จะหมัก การหมักอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลทั่วไปใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งน้ำตาลหลักที่จะให้บิวทานอล 13.7 กรัมต่อลิตร อะซิโตน 5.4 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 1.5 กรัมต่อลิตรในอาหารเหลว

Berezina และคณะ (2009) แยกแบคทีเรียที่เจริญในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic bacterium) สายพันธุ์ใหม่ที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสสูง และผลิตบิวทานอลและอะซิโตน โดยผลิตบิวทานอลประมาณ 80% ของตัวทำละลายทั้งหมด ลำดับของ 16S rDNA ที่ค่า 99% บ่งชี้ได้ว่าเป็น *C. saccharobutylicum* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างของดิน พืช ตะกอนหรือของเสียที่ถูกย่อยสลายที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรมในบริเวณใกล้เคียงและวิทยาเขตของมหาวิทยาลัย Technical University Munich ในประเทศเยอรมนี ทดสอบการผลิตตัวทำละลายโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography) ในขณะที่เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการผลิตบิวทานอลจะถูกตรวจสอบรูปร่างและขนาดของเซลล์รวมทั้งการเกิดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อให้มีความสอดคล้องกัน

Gholizadeh (2009) ผลิตบิวทานอลจาก *Clostridium* spp. ที่แตกต่างกัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. acetobutylicum* ATCC824, *C. beijerinckii* ATCC55025, BA101 และ NCIMB 8052 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร P2 ที่เสริมด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของกรดบิวทิริกเพิ่มเป็นสารตั้งต้นร่วมโดยหมักแบบกะในขวดซีรั่ม และ fibrous-bed bioreactor (FBB) และพบว่าบิวทิเรท 4.0 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เพิ่มผลผลิตของตัวทำละลายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักแบบ ABE และบิวทานอล ในจำนวนแบคทีเรียที่ทดสอบ *C. acetobutylicum* ATCC824 สายพันธุ์ดั้งเดิมถูกเลือกว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการผลิตบิวทานอล (บิวทานอล 10.3 และ 0.72 กรัมต่อลิตรที่มีและไม่มีบิวทิเรท 4.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ) แสดงการผลิตเพิ่มมากขึ้น 0.078 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (78.5%) และยังพบว่ามีความทนต่อบิวทิเรทที่ดีที่สุดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึงประมาณ 6.0 กรัมต่อลิตรและการดูดซึมกลูโคสสูงสุด (65.5%)

Mansur และคณะ (2010) ออกแบบการหมักน้ำอ้อยเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) ในระดับอุตสาหกรรมในประเทศบราซิล โรงงานแห่งนี้สร้างขึ้นเพื่อหมักน้ำตาล 40 ตันต่อชั่วโมง ทำงานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 32 สัปดาห์ระหว่างการเก็บเกี่ยวอ้อยเป็นเวลา 20 ปี ขั้นตอนหลักของกระบวนการมี 2 ขั้นตอนคือ การหมักและการแยกผลิตภัณฑ์ให้มีความบริสุทธิ์

ถึง 99.5% ส่วนการหมักประกอบด้วยถังปฏิกรณ์ขนาด 500,000 แกลลอนจำนวน 9 ถังที่เปลี่ยนอ้อยปริมาณมากให้เป็นอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE) ที่ให้ผลดีเท่ากับถังปฏิกรณ์ขนาด 500,000 แกลลอนจำนวน 2 ถังที่ใช้เซลล์และโครงการนี้ยังใช้ถังขนาดเล็กที่เพิ่มความเข้มข้นของเซลล์จากระดับของหลอดทดลองเป็นระดับถังหมัก ในส่วนของการแยกในระดับอุตสาหกรรมประกอบด้วยถังเก็บผลิตภัณฑ์ ตัวดักจับแก๊สเพื่อนำสารอินทรีย์ส่วนใหญ่ออกจากน้ำ เพื่อนำไปแยกต่อไป การออกแบบนี้ประสบความสำเร็จกับอัตราผลตอบแทนจากการลงทุน 35.67% และมูลค่าปัจจุบันสุทธิ 118,806,000 ดอลลาร์สหรัฐ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กระบอกฉีดยา (Syringe, 3ml และ 5ml)	(Nipro, Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	(Olympus, Japan)
ขวดซีรั่ม (Serum bottle)	(Amani, Thailand)
เข็มฉีดยา (Needle, 18Gx1)	(Nipro, Thailand)
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)	(Barnstead, USA)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator)	(Vision Sciencetific, Korea)
เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex mixer)	(Vision Sciencetific, Korea)
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	(Sartorius, Germany)
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)	(Hettich, Germany)
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 1000C	(Precisa, Switzerland)
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285	(Mettler Toledo, USA)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)	(Sturdy Industrial, Taiwan)
เครื่องปั่น (Blender)	(Moulinex, France)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (Waterbath)	(Memmert, Germany)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Spectrophotometer)	(ANTHOS Zenyth 200, USA)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	(Shimadzu, Japan)
เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography)	(GC-2010A Shimadzu, Japan)
จุกยาง (Gray butyl rubber stopper)	(Amani, Thailand)
ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic Chamber)	(Bactron Shellab, USA)
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	(EHRET, Germany)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)	(Mammert, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	(Clean model, Lab service Ltd)

โถบ่มเพาะเชื้อชนิดไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) (Merck, Germany)

ถุงแก๊สผสม (Genbox) (Biomérieux, France)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) (Gibthai,Thailand)

ฝาอลูมิเนียม (Aluminium crimp seal) (Amani, Thailand)

สารเคมี

กรดอะซิติก (Acetic acid) (Labscan, Thailand)

กรดบิวทิริก (Butyric acid) (Labscan, Thailand)

ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Scharlau, Spain)

น้ำตาลกลูโคส (Glucose) (Fluka, Switzerland)

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) (Fluka, Switzerland)

น้ำตาลฟรักโทส (Fructose) (Fluka, Switzerland)

บิวทานอล (Butanol) (Labscan, Thailand)

ผงสังกะสี (Zinc) (Fluka, Switzerland)

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) (Fluka, Switzerland)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) (Merck, Germany)

อะซิโตน (Acetone) (Merck, Germany)

เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (C_2H_5OH) (องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย)

เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (Absolute ethanol) (Merck, Germany)

แอมโมเนีย (Ammonia) (Merck, Germany)

Antimicrobic Vial K (Kanamycin) (Difco Laboratories, USA)

Antimicrobic Vial P (Polymyxin B) (Difco Laboratories, USA)

Biotin (Fluka, Switzerland)

Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM) (Fluka, Switzerland)

Lactose-gelatin medium (Difco Laboratories, USA)

L-cysteine (Fluka, Switzerland)

Motility test medium (Fluka, Switzerland)

n-propanol (Labscan, Thailand)

Nitrate broth	(Difco Laboratories, USA)
Para-Aminobenzoic Acid (PABA)	(Fluka, Switzerland)
Reinforced Clostridial Medium (RCM)	(Difco Laboratories, USA)
Resazurin	(Merck, Germany)
SFP agar	(Difco Laboratories, U.S.A)
Sheep blood agar plates	(Biomérieux, France)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เก็บตัวอย่างน้ำเสีย ตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างมูลสัตว์ จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยาและกรุงเทพมหานคร จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ใหม่และอุปกรณ์ที่สะอาด ดังนี้

1. น้ำเสียจากบ่อน้ำเสีย โดยทำการเก็บตัวอย่างจากก้นบ่อในบริเวณที่แตกต่างกัน 4 จุด
2. น้ำข้าวฟ่างหวานและกากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างคั้นสดและกากข้าวฟ่างที่เหลือจากการคั้นน้ำออก
3. ชานอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างจากกองชานอ้อยที่เหลือจากการหีบน้ำออกและเก็บไว้เป็นเวลานานไม่เกิน 3 เดือน
4. มูลวัวเก็บจาก 3 แหล่ง คือจากฟาร์มของเกษตรกร จังหวัดปทุมธานี จากตำหนักจิตรลดารโหฐาน กรุงเทพมหานคร และจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัด พระนครศรีอยุธยา
5. มูลควาย จากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
6. มูลช้าง จากวังช้างอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ตัวอย่างถูกเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาคัดแยก

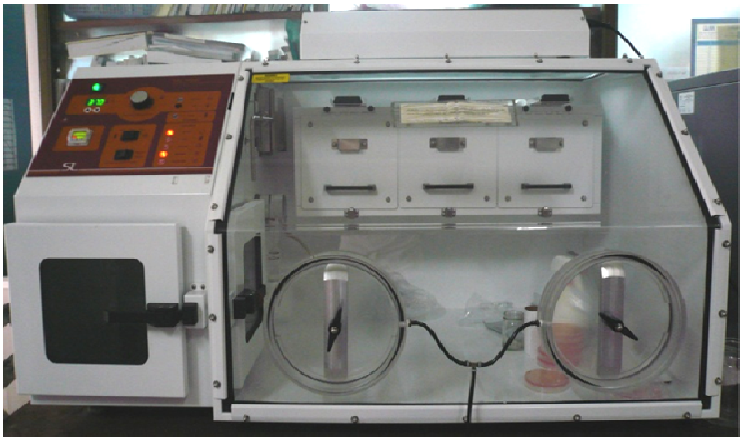
3.2 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Clostridium* spp.

ชั่งตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างมูลสัตว์ 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำเสีย 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร modified MS medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส โดยมีการแปรผันปริมาณน้ำตาลดังนี้ กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในสภาพไร้อากาศ ทั้งนี้เพื่อเป็นการเตรียมตัวอย่างให้พร้อม ก่อนการเติมตัวอย่าง 3 มิลลิลิตรลงในอาหารเพาะเลี้ยง Modified MS medium 27 มิลลิลิตร ที่มีการเติมแก๊สไนโตรเจนเพื่อปรับภายในขวดเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน และมีปริมาณน้ำตาลดังกล่าว จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat shock) ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

3.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

3.3.1 การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์

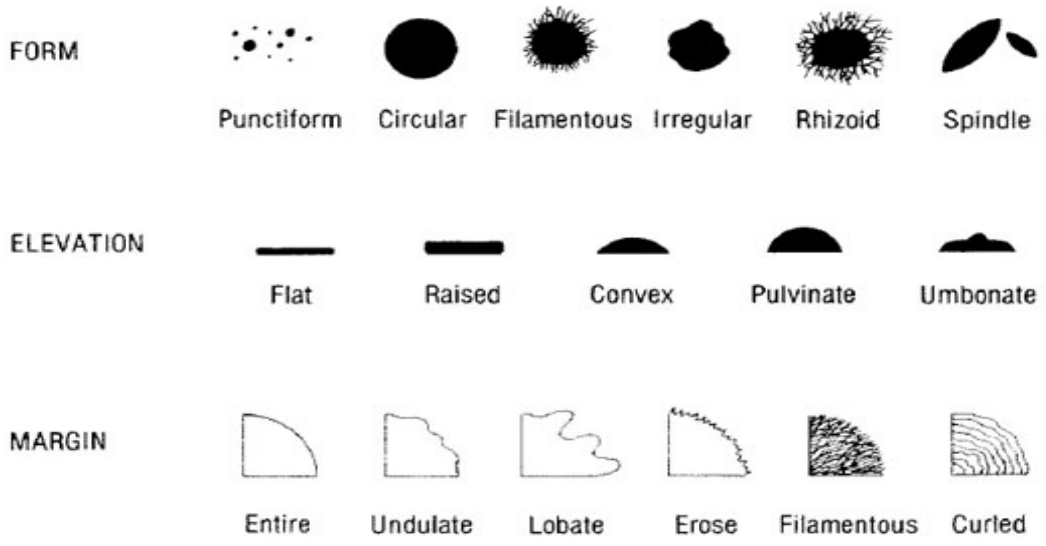
ดูดสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2 มา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง Modified MS agar plate ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จำนวน 3 ซ้ำ นำไปใส่ใน Anaerobic jar ที่ใส่ถุงแก๊สผสม (Genbox) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเชื้อมีปริมาณมากจนไม่สามารถแยกได้ ให้ทำการเจือจางเชื้อก่อน สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น บันทึกผลและเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวด้วยวิธีขีดลาก (Cross streak) บนอาหารแข็ง Modified MS agar plate ทำซ้ำจนกว่าเชื้อจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยในขั้นตอนการแยกเชื้อทั้งหมดกระทำภายตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber) (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Bactron anaerobic chamber) (Shellab, USA)

3.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสเบื้องต้น

เขี่ยเชื้อที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 3.2 มาใส่ในอาหาร modified MS medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการสร้างแก๊สภายในขวด จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญและสร้างแก๊สภายในขวดในภาวะดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงรูปร่าง ระดับความนูนและขอบของโคโลนีแบคทีเรีย (Pelczar และคณะ, 1957)

3.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

3.4.1 ศึกษาลักษณะ รูปร่างของเซลล์โดยวิธีการย้อมสีเซลล์ และรูปร่างของสปอร์โดยวิธีการย้อมสีสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Petitdemange และคณะ, 1984)

3.4.2 การวัดการเจริญ (Growth measurements) โดยวัดความขุ่นของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร (Hermann และคณะ, 1985) ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวขวดใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เก็บผลวัดการเจริญทุกวัน

3.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) (อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ, 2548) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อในอาหาร Motility test medium (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 -24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเชื้อนำอาหารมาต้มไล่ออกซิเจนออกและรอจนอาหารแข็งตัว เพาะเชื้อด้วยการใช้เข็มเขี่ยปลายตรงแตะเชื้อแล้วแทงลงในอาหารวุ้นลึกประมาณ ½ นิ้ว และอีกหลอดไม่เพาะเชื้อ บ่มที่ภาวะปลอดออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองสังเกตการเคลื่อนที่ของเชื้อ (Motile) ว่ามีการเคลื่อนที่ของเชื้อออกจากรอยที่แทงไว้หรืออยู่ที่รอยแทงเท่านั้น โดยใช้เชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

3.4.4 การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test) (Rhodehamel และ Harmon, 1998) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate) ไปเป็นไนไตรท์ (Nitrite) หรือแก๊สไนโตรเจนในอาหาร Nitrate broth (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 -24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเชื้อลงในอาหาร Nitrate broth แต่ละหลอด บ่มที่ภาวะปลอดออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ ตรวจสอบผลการทดลองโดยเติมสารละลาย A (reagent A) 0.5 มิลลิลิตรและสารละลาย B (reagent B) อีก 0.2 มิลลิลิตร ลงใน Nitrate medium สังเกตการเปลี่ยนสีเป็นสีแดงภายใน 5 นาที แสดงว่าแบคทีเรียมีการรีดิวส์จากไนเตรทเป็นไนไตรท์อย่างสมบูรณ์ (Complete positive test) แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนสีให้เติมผงสังกะสี (Zinc) ลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2–3 นาที ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงหลังจากเติมผงสังกะสี แสดงว่ามีไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์เรียบร้อยแล้ว

(Positive test) แต่ถ้ามีการเปลี่ยนสีแสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (Negative test)

3.4.5 การทดสอบการสร้าง Lecithinase (Rhodehamel และ Harmon, 1998) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการสร้าง Lecithinase ที่ย่อยเลซิทิน (Lecithin) ในไข่แดง จะให้ผลเป็นฟอสโฟริลโคลีน (Phosphorylcholine) และไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) ที่ไม่ละลายน้ำเกิดเป็นตะกอนขุ่นขาวขึ้นรอบโคโลนีสีดำ โดยเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18 -24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเชื้อ ดูดสารละลายเชื้อมา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง SFP agar ที่มีการเติม 50% Egg yolk emulsion (ภาคผนวก ก) ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นปิดทับผิวหน้าด้วย SFP agar ที่ไม่มีการเติม 50% Egg yolk emulsion หลังจากวุ้นแข็ง นำไปใส่ใน Anaerobic jar ที่ใส่ถุงแก๊สผสม (GasPak) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตสีของโคโลนีและตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี

3.4.6 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolysis) (Rhodehamel และ Harmon, 1998) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เชื้อที่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะปรากฏเป็นวงใสอยู่รอบโคโลนี แต่เชื้อที่ไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะไม่เกิดวงใสอยู่รอบโคโลนี โดยเพาะเชื้อในอาหาร Sheep blood agar plates ก่อนการเพาะเชื้อต้องทำให้อาหารอยู่ในสภาวะแอนแอโรปส์ (Anaerobic condition) 6-24 ชั่วโมง เพาะเชื้อด้วยวิธีขีดลาก (Cross streak) นำไปใส่ใน anaerobic jar ที่ใส่ถุงแก๊สผสม (GasPak) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยในขั้นตอนการเพาะเชื้อทั้งหมดกระทำภายตู้เขี่ยเชื้อในสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber)

3.4.7 การทดสอบการรีดิวส์ซัลไฟท์ (Sulfite reduction) (Virunanon และคณะ, 2008) เป็นการตรวจสอบความสามารถในการรีดิวส์ซัลไฟท์ไปเป็นซัลไฟด์ ผลิต Iron sulfide ทำให้โคโลนีและอาหารเป็นสีดำ โดยมี L-cysteine hydrochloride เป็น Reducing agent โดยเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเชื้อในอาหาร Differential reinforced clostridial medium (DRCM) (ภาคผนวก ก) ต้องทำให้อาหารอยู่ในสภาวะแอนแอโรปส์ (Anaerobic condition) 6-24 ชั่วโมง เพาะเชื้อด้วยวิธีขีดลาก นำไปใส่ใน anaerobic jar ที่ใส่ถุงแก๊สผสม (GasPak) บ่มที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยในขั้นตอนการเพาะเชื้อทั้งหมดกระทำภายตู้เขี่ยเชื้อในสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber)

3.5 การเตรียมจุลินทรีย์

3.5.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

วัดความขุ่นของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 (Ezeji และคณะ, 2007) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วัดการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0

3.5.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ดูดเชื้อจากข้อ 3.4.2 ด้วยเข็มฉีดยาปริมาตร 3 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว Modified MS medium 27 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.6 การศึกษาความทนบิวทานอลและการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp.

3.6.1 การศึกษาความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว Modified MS medium ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของบิวทานอลเป็น 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 กรัมต่อลิตร กระตุ้นด้วยความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วัดการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A_{600}) ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer บันทึกผลการเจริญ

3.6.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp.

วัดความขุ่นของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 1.0 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Modified MS medium 3 มิลลิลิตร ที่มีน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นที่ 3, 6 และ 8 เปอร์เซนต์ (v/v) เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (w/v) จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อน (heated shock) ในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักทุกวัน กระบวนการหมักทำในภาวะไร้ออกซิเจนโดยการเติมแก๊สไนโตรเจนลงในอาหารที่ความดัน 5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที

3.7 ทดสอบการหมักแบบไร้ออกซิเจนจาก *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

นำความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมและ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้มาทำการหมักภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT®A plus, Satorius) working volumn เท่ากับ 3 ลิตร ใช้กล้าเชื้อ (Inoculums) 10 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นกวนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 5.0 ตลอดการทดลองด้วย แอมโมเนียและกรดอะซิติก และทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุกวัน เพื่อนำไปวัดการเจริญ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและปริมาณน้ำตาล

3.8 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมัก ตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะถูกเก็บที่แต่ละช่วงเวลาของการหมักเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาการเจริญของจุลินทรีย์โดยวัดความขุ่นของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer หาปริมาณผลผลิตของบิวทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (GC-2010A Shimadzu, Japan) ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีด (Injector) และตัวตรวจจับ (Detector) เท่ากับ 45, 250 และ 260 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวนำ (Carrier gas) ผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์ คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu LC-20A series, Japan) สำหรับ Mobile phase สารA คือ อะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) สารB คือ น้ำกลั่น (HPLC grade) อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดย

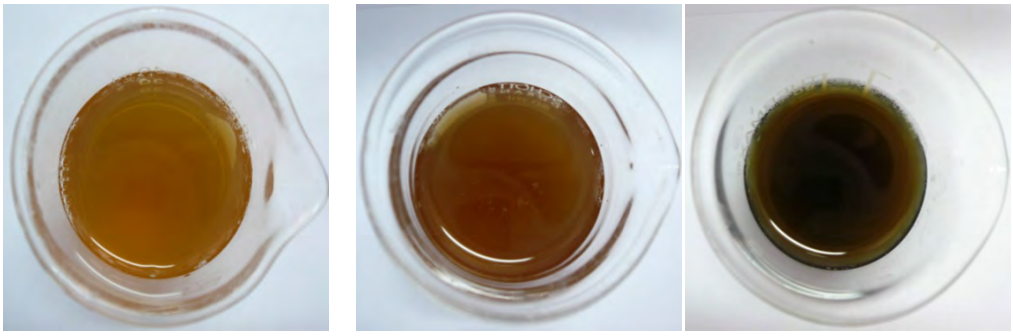
ใช้ NH_2 column, 5 µm, 250 × 4.6 mm ตัวตรวจจับสำหรับ HPLC คือ ELSD ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์คำนวณออกมาเป็นน้ำหนัก/ปริมาตร (% w/v)

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

ผลการวิเคราะห์

4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างน้ำเสีย ตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างมูลสัตว์ถูกเก็บจาก 4 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.1)



(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

(ช) (ซ) (ญ)

(ฎ) (ฏ) (ฐ)

ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ (ก) น้ำเสียจุดที่ 1 (ข) น้ำเสียจุดที่ 2 (ค) น้ำเสียจุดที่ 3 (ง) น้ำเสียจุดที่ 4 (จ) น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 (ฉ) กากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 (ช) ชานอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา (ซ) มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร จังหวัดปทุมธานี (ญ) มูลวัวจากพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน กรุงเทพมหานคร (ฎ) มูลวัวจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ฏ) มูลควายจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ฐ) มูลช้างจากวังช้างอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ตัวอย่างชานอ้อยและกากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 จะถูกนำมาการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ โดยตัดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้พร้อมต่อการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Clostridium* spp.

เมื่อเติมตัวอย่าง 3 มิลลิลิตรลงในอาหาร Modified MS medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตรที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลดังนี้ ซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อนในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญเบื้องต้นของเชื้อจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Virunanon และคณะ, 2008) ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร พบว่าตัวอย่างที่ทำให้อาหารมีความขุ่นมี 4 ตัวอย่าง ในขณะที่สูตรอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าตัวอย่างที่ทำให้อาหารขุ่นมีเพียง 2 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

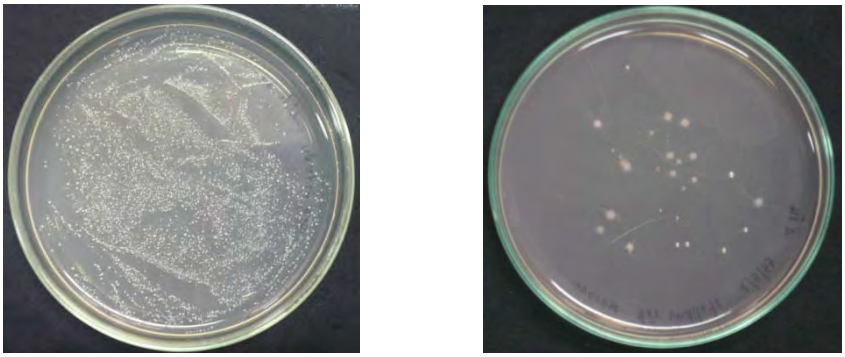
ตารางที่ 4.1 การเจริญของ *Clostridium* spp. ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตรจากแต่ละตัวอย่าง

แหล่งของตัวอย่าง	ซูโครส 60 กรัมต่อลิตร	กลูโคส30 กรัมต่อลิตรและซูโครส 30 กรัมต่อลิตร
น้ำเสียจุดที่ 1	-	-
น้ำเสียจุดที่ 2	-	-
น้ำเสียจุดที่ 3	-	-
น้ำเสียจุดที่ 4	-	-
น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40	+	+
กากข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40	-	-
ชานอ้อย	-	-
มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร	+	+
มูลวัวจากพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน	-	-
มูลวัวจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ	+	-
มูลควายจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ	-	-
มูลช้างจากวังช้างอยุธยา	+	-

4.3 การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

4.3.1 การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จาก 12 ตัวอย่างที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร พบว่ามี 83 ไอโซเลท (ภาพที่ 4.2) ที่สามารถเจริญในสูตรอาหารดังกล่าวได้ดังตารางที่ 4.2



(ก) (ข)

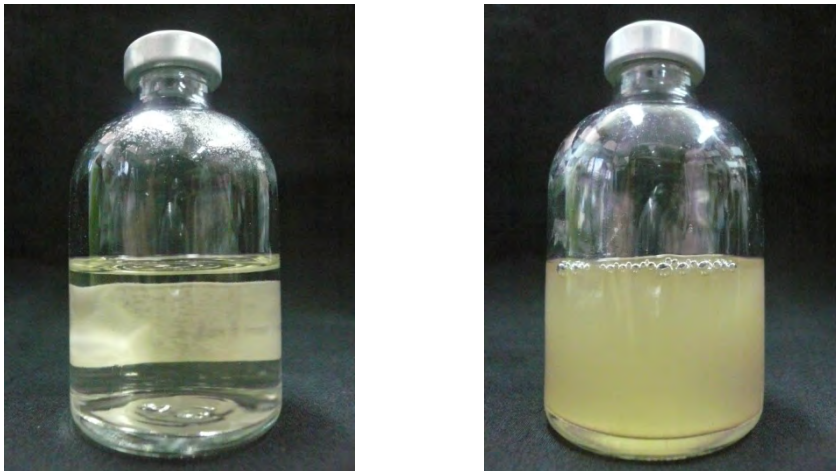
ภาพที่ 4.2 โคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. บนอาหาร Modified MS agar plate ที่มีการแปรผันปริมาณ (ก) น้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและ (ข) น้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลทจากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ ที่เจริญในอาหารที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

แหล่งของตัวอย่าง	ซูโครส 60 กรัมต่อลิตร	ชื่อของเชื้อที่คัดเลือก	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตรและซูโครส 30 กรัมต่อลิตร	ชื่อของเชื้อที่คัดเลือก
น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40	3 ไอโซเลท	SS1-SS3	13 ไอโซเลท	SG1-SG13
มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร	15 ไอโซเลท	CS1-CS15	7 ไอโซเลท	CG1-CG7
มูลวัวจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริ	27 ไอโซเลท	CA1-CA27	-	-
มูลช้างจากวังช้างอยุธยา	18 ไอโซเลท	ES1-ES18	-	-

4.3.2 การคัดเลือกเบื้องต้น

นำแบคทีเรียที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหาร Modified MS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการสร้างแก๊สภายในขวด (ภาพที่ 4.3) ในขั้นตอนนี้พบว่าจาก 83 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ มีเพียง 35 ไอโซเลทที่มีการสร้างแก๊สภายในขวดซึ่งมีลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ภาพที่ 4.4) (Pelczar และคณะ, 1957) ดังตารางที่ 4.3



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.3 อาหาร Modified MS broth ขวดควบคุม (ก) และการสร้างแก๊สของเชื้อ *Clostridium* sp. ภายในขวด (ข)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

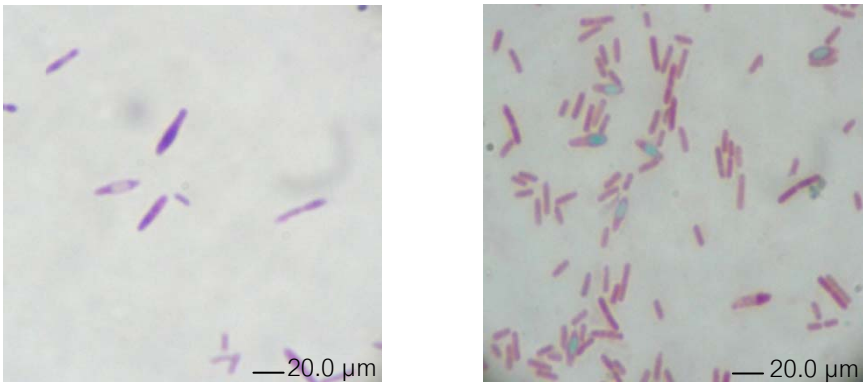
ชื่อของเชื้อที่คัดเลือก	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (Form)	ระดับความนูน (Elevation)	ลักษณะผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี
SS1	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	White
SS2	0.2	Irregular	Pulvinate	Smooth	Entire	Pink
SS3	0.3	Circular	Pulvinate	Smooth	Entire	Yellow
SG1	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	White
SG2	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	Brown
SG3	0.2	Irregular	Umbonate	Rough	Undulate	Brown
SG4	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	White
SG5	0.1	Circular	Umbonate	Smooth	Entire	White
SG6	0.1	Circular	Umbonate	Smooth	Entire	White
SG8	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	Yellow
SG10	0.4	Irregular	Umbonate	Rough	Undulate	Yellow
SG11	0.3	Irregular	Umbonate	Smooth	Undulate	Brown

ชื่อของเชื้อที่คัดเลือก	เส้นผ่านศูนย์กลาง	รูปร่าง (form)	ระดับความนูน (elevation)	ลักษณะผิวหน้า (surface)	ขอบ (margin)	สี
SG12	0.4	Irregular	Pulvinate	Smooth	Undulate	Brown
SG13	0.5	Irregular	Umbonate	Smooth	Undulate	White
CS1	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	White
CS2	0.2	Irregular	Umbonate	Smooth	Entire	Cream
CS3	0.1	Irregular	Convex	Smooth	Entire	Cream
CS4	0.15	Circular	Flat	Smooth	Entire	Cream
CS5	0.1	Circular	Convex	Smooth	Entire	Cream
CS6	0.2	Irregular	Pulvinate	Smooth	Entire	Yellow
CS7	0.3	Circular	Convex	Smooth	Entire	Cream
CS8	0.15	Irregular	Umbonate	Rough	Entire	Cream
CS9	0.1	Irregular	Umbonate	Rough	Undulate	Cream
CS10	0.2	Irregular	Umbonate	Smooth	Undulate	Brown
CS11	0.05	Circular	Convex	Smooth	Entire	White
CS12	0.15	Circular	Flat	Smooth	Entire	Cream
CS13	0.15	Circular	Convex	Smooth	Entire	Cream
CS14	0.1	Irregular	Umbonate	Rough	Undulate	Brown
CS15	0.15	Irregular	Umbonate	Rough	Undulate	Brown
CG1	0.1	Irregular	Convex	Smooth	Undulate	Cream
CG2	0.15	Irregular	Convex	Smooth	Undulate	Brown
CG3	0.1	Circular	Pulvinate	Smooth	Entire	Brown
CG4	0.2	Filamentous	Convex	Smooth	Filamentous	Brown
CG5	0.1	Circular	Pulvinate	Smooth	Entire	Brown
CG7	0.1	Circular	Pulvinate	Smooth	Entire	Brown

4.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

4.4.1 ศึกษาลักษณะ รูปร่างของเซลล์และสปอร์ (Cell shape and spore)

เลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อนำไปสเมียร์ (Smear) บนสไลด์สะอาด ทำการตรึงเซลล์ให้ติดแน่น (fix) ด้วยการผ่านเปลวไฟ จากนั้นนำไปย้อมสีเพื่อตรวจดูการติดสีแกรมและการสร้างสปอร์ (Petitdemange และคณะ, 1984) ของเชื้อที่คัดแยก โดยเชื้อ *Clostridium* spp. จะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) (ภาพที่ 4.5 ก) สปอร์รูปไข่บริเวณใกล้ปลายเซลล์ (ภาพที่ 4.5 ข) ซึ่งพบว่าจาก 38 ไอโซเลทมีเพียง 25 ไอโซเลท ได้แก่ SS1-SS3 SG1-SG5 SG8-SG13 CS1-CS3 CS6 CS8-CS10 CS14-CS15 CG1 และ CG2 ที่แสดงคุณสมบัติทั้งสอง

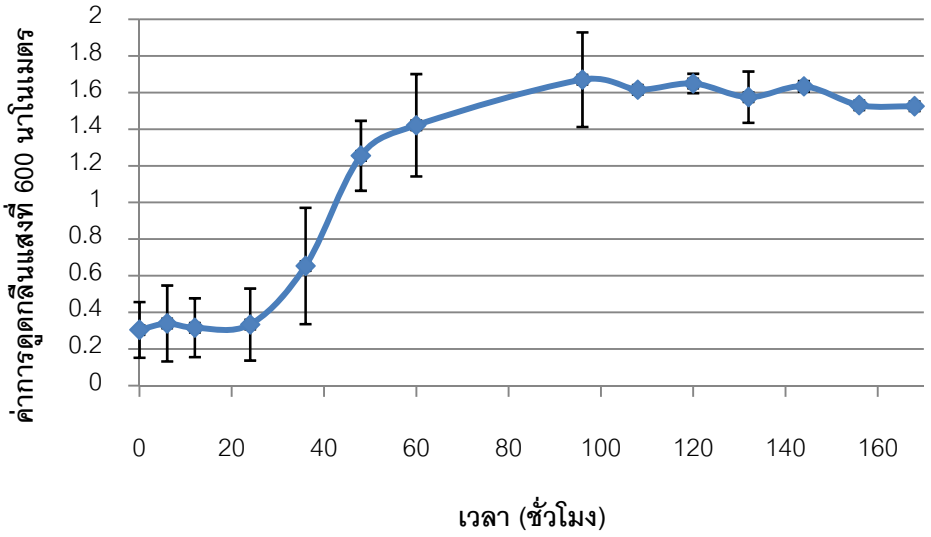


(ก) (ข)

ภาพที่ 4.4 รูปร่างเซลล์ของเชื้อ *Clostridium* spp. ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ซึ่งแสดงถึงแกรมบวก (ก) และลักษณะของสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์ย้อมติดสีเขียวของ Malachite green (ข) เมื่อส่องดูด้วยกำลังขยาย 100 เท่า

4.4.2 การวัดการเติบโต (Growth measurements)

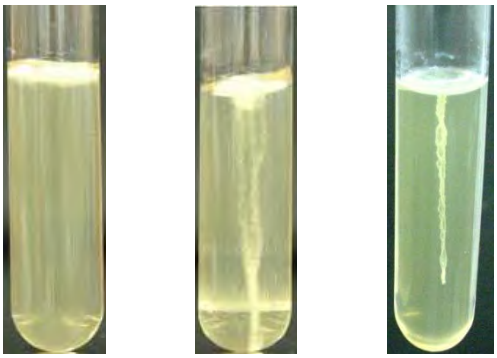
ดูดสารแขวนลอย (Suspension) ที่เลี้ยงในอาหาร Modified MS medium มาแล้วเป็นเวลา 7 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าประมาณ 1.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตรใส่ในอาหาร Modified MS medium ขวดใหม่ เก็บผลการทดลองทุก 12 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเชื้อที่ 600 นาโนเมตร (Hermann และคณะ, 1985) โดยในชั่วโมงที่ 0-24 เป็นการเจริญในช่วง Lag phase ชั่วโมงที่ 24-60 เป็นการเจริญในช่วง Log phase ชั่วโมงที่ 60-144 เป็นการเจริญในช่วง Stationary phase และชั่วโมงที่ 144-168 เป็นช่วง Dead phase ได้ผลดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.5 การเจริญของไอโซเลท CG1 ในอาหาร Modified MS medium เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

4.4.3 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

ตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อในอาหาร Motility test medium โดยเลี้ยงเชื้อให้มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเชื้อนำอาหารมาต้มไล่ออกซิเจนออกและรอจนอาหารแข็งตัว หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงพบว่าทั้ง 25 ไอโซเลทสามารถเคลื่อนที่ได้ดังภาพที่ 4.7

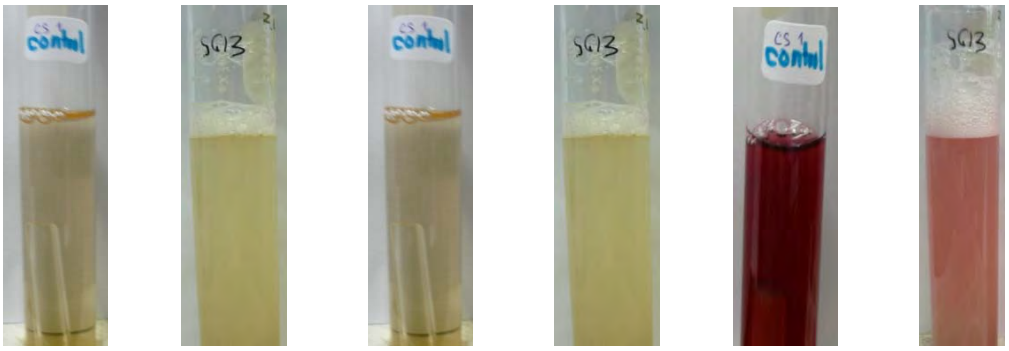


(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 4.6 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ *Clostridium* sp. ที่คัดแยกได้ (ก) ผลลบของเชื้อ *Escherichia coli* (ข) ผลบวกของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (ค) ผลบวกของไอโซเลท CG1

4.4.4 การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate reduction test)

ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรท (Nitrate) ในอาหาร nitrate broth หลังจากย เลี้ยงเชื้อในอาหาร Nitrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24-48 ชั่วโมง ผลการ ทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8



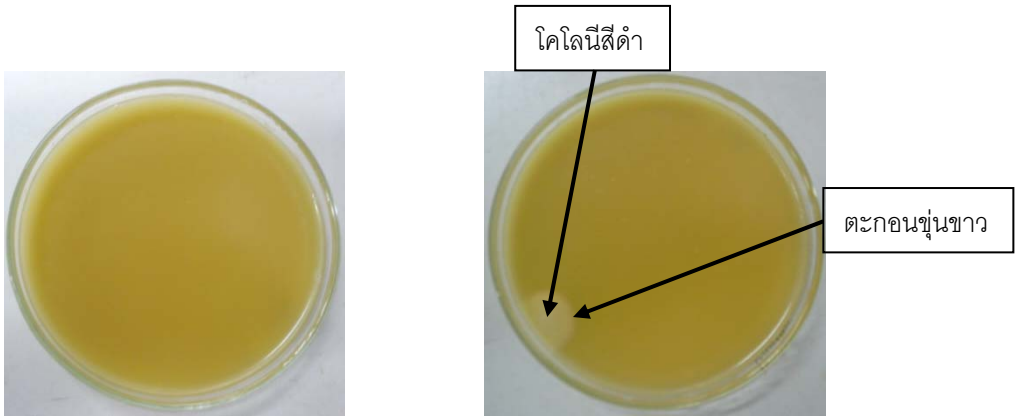
(ก) (ข) (ค) (ง) (จ) (ฉ)

ภาพที่ 4.7 ความสามารถในการรีดิวส์ไนเตรทของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ (ก) หลอดควบคุมหลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง (ข) ไอโซเลท SG13 หลังบ่มนาน 48 ชั่วโมง (ค) ผลของ หลอดควบคุมเมื่อเติมสารละลาย A และสารละลาย B (ง) ผลของไอโซเลท SG13 เมื่อเติม สารละลาย A และสารละลาย B (จ) ผลของหลอดควบคุมเมื่อเติมผงสังกะสี (ฉ) ผลของไอโซเลท SG13 เมื่อเติมผงสังกะสี

หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยเติม สารละลาย A (reagent A) 0.5 มิลลิลิตรและสารละลาย B (reagent B) อีก 0.2 มิลลิลิตร พบว่า หลอดควบคุมและทั้ง 25 ไอโซเลทไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จากนั้นยืนยันผลโดยการเติมผงสังกะสี (Zinc) ลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2–3 นาที พบว่าอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งให้ผลลบ (Negative test) แสดงว่าเชื้อทั้ง 25 ไอโซเลทไม่รีดิวส์ไนเตรท

4.4.5 การทดสอบการสร้าง Lecithinase

ตรวจสอบความสามารถในการสร้าง Lecithinase ที่ย่อยเลซิทิน (Lecithin) ในไข่แดง หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำจานอาหารมาตรวจดูการเกิดตะกอนขุ่นขาวขึ้นรอบโคโลนีสีดำ ผลแสดงดังภาพที่ 4.9 ซึ่งพบว่าทั้ง 25 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ไม่เป็นเชื้อก่อโรค เนื่องจากไม่มีการสร้าง Lecithinase ในขณะที่ไอโซเลท CA9 พบตะกอนขุ่นขาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรขึ้นรอบโคโลนีสีดำขนาด 1 มิลลิเมตรจากการสร้าง Lecithinase ซึ่งแสดงคุณสมบัติของเชื้อก่อโรคเบื้องต้น



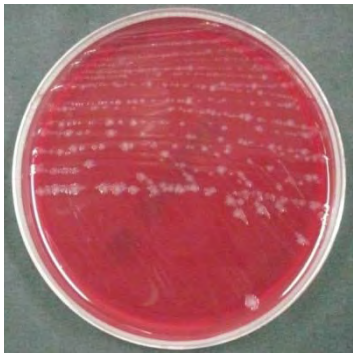
(ก) (ข)

ภาพที่ 4.8 plate ที่เกลี่ยด้วยไอโซเลท CG1 (ก) และplate ที่เกลี่ยด้วยไอโซเลท CA9 (ข)

จากภาพที่ 4.9 (ก) ไม่ปรากฏการเติบโตของเชื้อที่เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารในขณะที่ภาพที่ 4.9 (ข) ปรากฏโคโลนีสีดำที่ล้อมรอบด้วยตะกอนขุ่นขาวที่เป็นคุณสมบัติของการสร้าง Lecithinase ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้จะไม่พบใน *Clostridium* spp. ที่ผลิตตัวทำละลาย แต่จะพบใน *Clostridium* spp. ที่เป็นสายพันธุ์ก่อโรคซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Shahidi และ Ferguson (1971) ที่เลี้ยงเชื้อ *C. perfringens* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค บนอาหาร SFP agar และพบว่าหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โคโลนีที่ปรากฏจะมีสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ถึง 2 มิลลิเมตรล้อมรอบด้วยการตกตะกอนเป็นโซนสีขาวทึบแสงเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ถึง 4 มิลลิเมตรอย่างชัดเจนซึ่งบอกให้ทราบว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้ไม่ใช่สายพันธุ์ก่อโรค (Eisgruber และคณะ, 2000)

4.4.6 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Haemolysis)

ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ในอาหาร Sheep blood agar plate หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 4.10

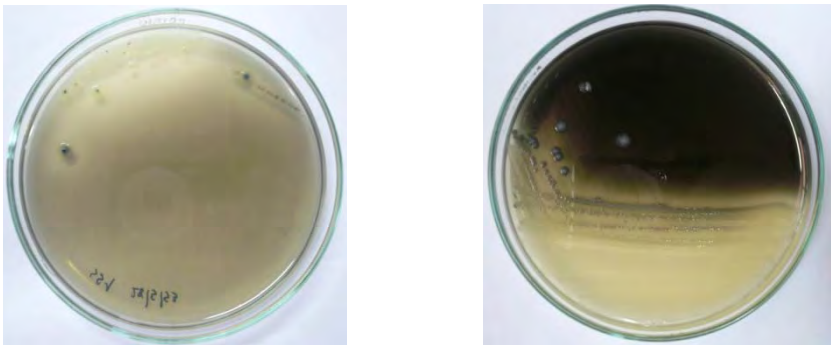


ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบน Sheep blood agar plate ของไอโซเลท CG1

โคโลนีเจริญตามรอยขีดลากมีสีขาวแต่ไม่พบว่ามีคุณสมบัติในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งบ่งบอกว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้ทั้ง 25 ไอโซเลทไม่ใช่สายพันธุ์ก่อโรค (Eisgruber และคณะ, 2000)

4.4.7 การทดสอบการรีดิวส์ซัลไฟท์ (Sulfite reduction)

ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวส์ซัลไฟท์ของเชื้อ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารที่เกิดขึ้นแสดงดังภาพที่ 4.11



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.10 (ก) สีของโคโลนีและอาหารเมื่อขีดลากด้วยไอโซเลท SS1 (ข) สีของโคโลนีและอาหารเมื่อขีดลากด้วยไอโซเลท CG1

Clostridium spp. สายพันธุ์ที่ผลิตตัวทำละลายได้สามารถรีดิวส์ซัลไฟท์ไปเป็นซัลไฟด์ (Virunanon และคณะ, 2008) ผลิต Iron sulfide โดยมี L-Cysteine hydrochloride เป็น Reducing agent ทำให้โคโลนีที่เกิดขึ้นและอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) ของ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	การเคลื่อนที่	การรีดิวส์ไนเตรท	การสร้าง Lecithinase	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	การรีดิวส์ซัลไฟท์
SS1	บวก	+	+	-	-	-	+
SS2	บวก	+	+	-	-	-	+
SS3	บวก	+	+	-	-	-	+
SG1	บวก	+	+	-	-	-	+
SG2	บวก	+	+	-	-	-	+
SG3	บวก	+	+	-	-	-	+
SG4	บวก	+	+	-	-	-	+
SG5	บวก	+	+	-	-	-	+
SG6	บวก	-	-	-	+	+	+
SG8	บวก	+	+	-	-	-	+
SG10	บวก	+	+	-	-	-	+
SG11	บวก	+	+	-	-	-	+
SG12	บวก	+	+	-	-	-	+
SG13	บวก	+	+	-	-	-	+
CS1	บวก	+	+	-	-	-	+
CS2	บวก	+	+	-	-	-	+
CS3	บวก	+	+	-	-	-	+
CS4	บวก	-	-	-	-	+	-
CS5	ลบ	-	-	-	-	+	-

ไอโซเลท	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	การเคลื่อนที่	การรีดิวส์ไนเตรท	การสร้าง Lecithinase	การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	การรีดิวส์ซัลไฟท์
CS6	บวก	+	+	-	-	-	+
CS7	บวก	-	-	-	-	+	-
CS8	บวก	+	+	-	-	-	+
CS9	บวก	+	+	-	-	-	+
CS10	บวก	+	+	-	-	-	+
CS11	บวก	-	-	-	+	+	-
CS12	ลบ	-	-	-	-	+	-
CS13	บวก	-	-	-	-	+	-
CS14	บวก	+	+	-	-	-	+
CS15	บวก	+	+	-	-	-	+
CG1	บวก	+	+	-	-	-	+
CG2	บวก	+	+	-	-	-	+
CG3	บวก	-	-	-	-	+	-
CG4	บวก	-	-	-	+	-	-
CG5	บวก	-	-	-	-	+	-
CG7	บวก	-	-	-	-	-	-

4.5 การศึกษาความทนบิวทานอลและการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp.

4.5.1 การศึกษาความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้

หลังจากเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว Modified MS medium ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของบิวทานอลเป็น 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ SG10, SG13, CG1, CS7 และ CS11 ที่สามารถทนบิวทานอลได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าที่ Knoshaug และ Zhang (2009) รายงานว่าในการหมักแบบกะ (Batch fermentation) *Clostridium* sp. มีความไวต่อบิวทานอลและโดยปกติแล้วจะไม่สามารถผลิตหรือ

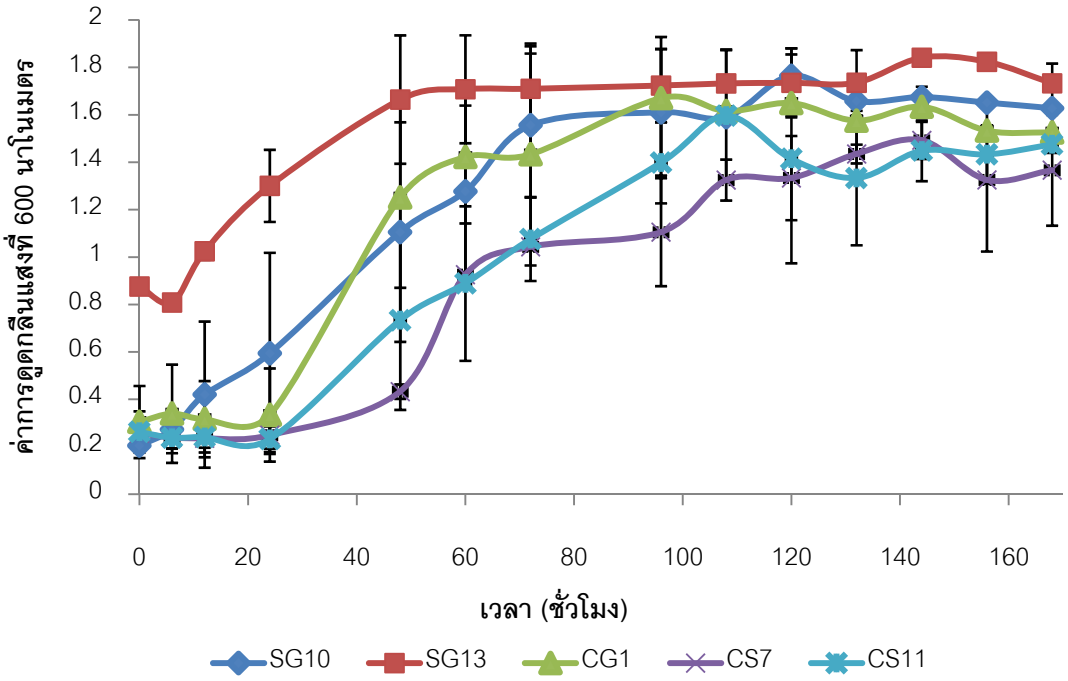
ทนบิวทานอลเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยีสต์สกุล *Saccharomyces* และยีสต์ชนิดอื่น ๆ ก็สามารถทนบิวทานอลได้ 1 ถึงเกือบ 2 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.5 ความทนบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้สูงสุด 5 ไอโซเลท

	ความเข้มข้นบิวทานอล (กรัมต่อลิตร)						
ไอโซเลท	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
SG10	+	+	+	+	+	+	-
SG13	+	+	+	+	+	+	-
CG1	+	+	+	+	+	+	-
CS7	+	+	+	+	+	+	-
CS11	+	+	+	+	+	+	-

4.5.2 การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักด้วย *Clostridium* spp.

ไอโซเลทที่ทนบิวทานอลได้สูงที่สุด 5 ไอโซเลทถูกคัดเลือกมาผลิตตัวทำละลาย ในอาหารอาหารเหลว Modified MS medium ในขวดซีรั่มที่มีน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นที่ 6 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเพื่อให้เกิดการหมักและผลิตผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 7 วัน ตัวอย่างถูกนำไปวัดการเจริญ (ภาพที่ 4.12) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแบ่งเป็น ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล และเกิดกรด 2 ชนิด คือ กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก (Jones และ Woods, 1986) ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลซูโครส (ตารางที่ 4.4) และน้ำอ้อย (ตารางที่ 4.5) ที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ 60 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.11 การเจริญของ *Clostridium* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทในระยะเวลา 7 วัน

แนวโน้มการเจริญของไอโซเลท SG10, SG13 และ CG1 เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีช่วง Lag phase ถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นเริ่มเข้าสู่ Log phase ที่พบว่าปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและ Stationary phase ที่อัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตายเริ่มที่ชั่วโมงที่ 48 และเข้าสู่ Dead phase ที่ 140 ชั่วโมง ในขณะที่ไอโซเลท CS7 และ CS11 นั้นมีช่วงของ Lag phase ที่ยาวนานกว่าถึง 48 ชั่วโมง ไอโซเลท CS11 มีช่วง Log phase ที่สั้นกว่าไอโซเลท CS7 และยังไม่เข้าสู่ช่วง Dead phase ถึงแม้จะเข้าสู่ชั่วโมงที่ 140

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีพื้นที่เพาะปลูกอ้อยและให้ผลผลิตอ้อยปริมาณมาก นอกจากนี้น้ำอ้อยยังมีองค์ประกอบหลัก คือ น้ำตาลซูโครสซึ่งมีปริมาณมากที่สุด (Walford, 1996) จัดว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกแหล่งหนึ่ง และเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำอ้อยไปเป็นบิวทานอลได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการปรับสภาพและการย่อย (Sánchez และ Cardona, 2008)

ตารางที่ 4.6 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักในวันที่ 7 ในอาหารเหลว Modified MS medium ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

ไอโซเลท	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	รวม (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	กรดรวม (กรัมต่อลิตร)
SG10	0.85	3.12	1.02	4.99	2.38	0.77	3.15
SG13	0	0.88	0.39	1.27	0.04	0.04	0.08
CG1	0.30	3.67	2.11	6.08	1.33	0.59	1.92
CS7	0.12	0.97	1.02	2.11	2.73	1.72	4.45
CS11	0.42	0.73	0.45	1.6	2.46	0.66	3.12

ตารางที่ 4.7 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักในวันที่ 7 ในอาหารเหลว Modified MS medium ที่ใช้น้ำอ้อยความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

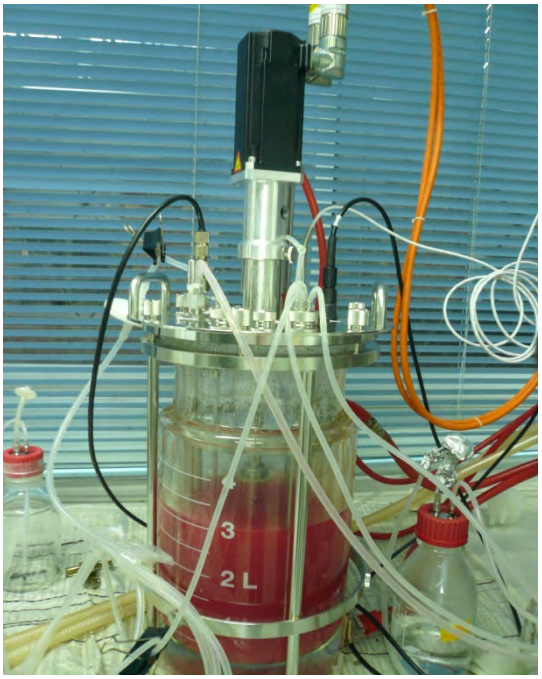
ไอโซเลท	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	รวม (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)	กรดรวม (กรัมต่อลิตร)
SG10	0.01	0.52	0.55	1.08	1.44	0.75	2.19
SG13	0.02	1.08	1.04	2.14	1.54	0.47	2.01
CG1	0.02	1.45	1.22	2.17	0.52	0.67	1.19
CS7	0.04	1.21	0.63	1.88	1.22	1.18	2.4
CS11	0.27	0.63	1.08	1.98	0.97	0.31	1.28

จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักของทั้ง 5 ไอโซเลทเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสและการใช้น้ำอ้อยผสมในอาหารสังเคราะห์พบว่าไอโซเลท CG1 ผลิตตัวทำละลาย (ABE) ได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและน้ำอ้อยความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร คือ 6.08 และ 2.17 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ในขณะที่ไอโซเลท SG13 ผลิตตัวทำละลายจากอาหารที่มี

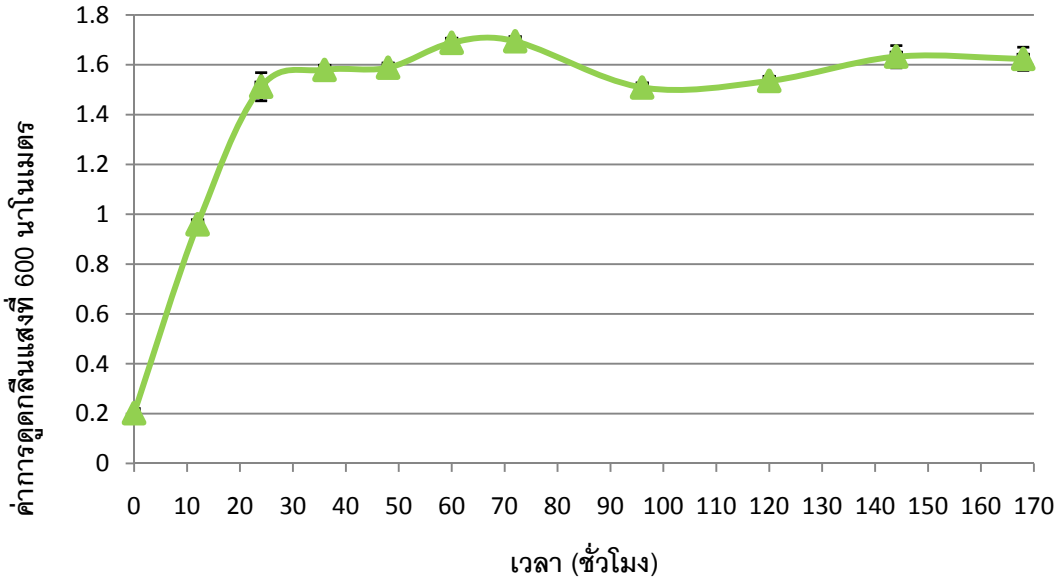
น้ำอ้อยความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรได้มากกว่าอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร คือ 2.14 และ 1.27 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

4.6 ทดสอบการหมักแบบไร้ออกซิเจนจาก *Clostridium* spp. ที่คัดแยกได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

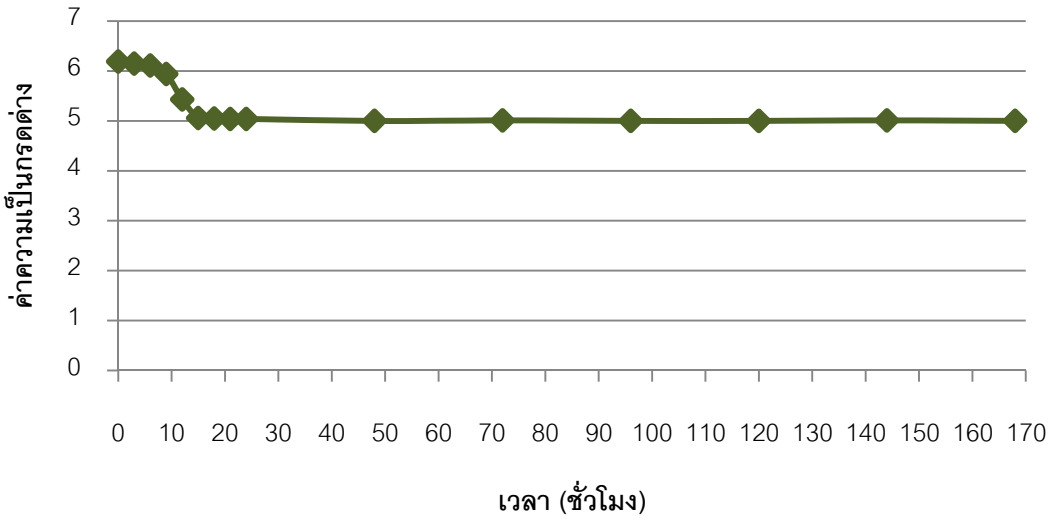
ไอโซเลทที่ผลิตตัวทำละลาย (ABE) ได้มากที่สุด คือ CG1 ทำการหมักภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT®A Plus, Satorius) (ภาพที่ 4.13) โดยใช้อาหาร Modified MS medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดการเติบโตซึ่งการเติบโตในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าไม่มีการเติบโตในช่วง Lag phase (ภาพที่ 4.14) เนื่องจากกล้าเชื้อที่ใส่ลงไปอยู่ในช่วง Log phase และเลี้ยงในอาหารและสภาวะเดียวกันจึงสามารถเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วโดยทำให้ไม่ต้องมีช่วงของการปรับสภาพของเซลล์ จึงเข้าสู่ช่วง Log phase ทันทีเมื่ออยู่ในถังหมักซึ่งเป็นช่วงการสร้างกรด (Acidogenic phase) ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 4.14) จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วงการผลิตตัวทำละลาย (Solventogenic phase) ค่าความเป็นกรดด่างถูกทำให้คงที่อยู่ที่ 5.0 ตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (ภาพที่ 4.15) พบว่าไอโซเลท CG 1 ใช้น้ำตาลกลูโคสหมดที่ 96 ชั่วโมงในขณะที่ไม่ใช้น้ำตาลซูโครสเลย เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าซูโครสและเมื่อปริมาณกลูโคสหมดเซลล์จึงเริ่มใช้ซูโครสแต่ปริมาณที่ใช้ยังน้อยเมื่อเทียบกับกลูโคส ในขณะที่การผลิตผลิตภัณฑ์ (ภาพที่ 4.16) ยังสามารถผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 144 จนเข้าสู่ช่วง Dead phase ปริมาณผลิตภัณฑ์จึงลดลง



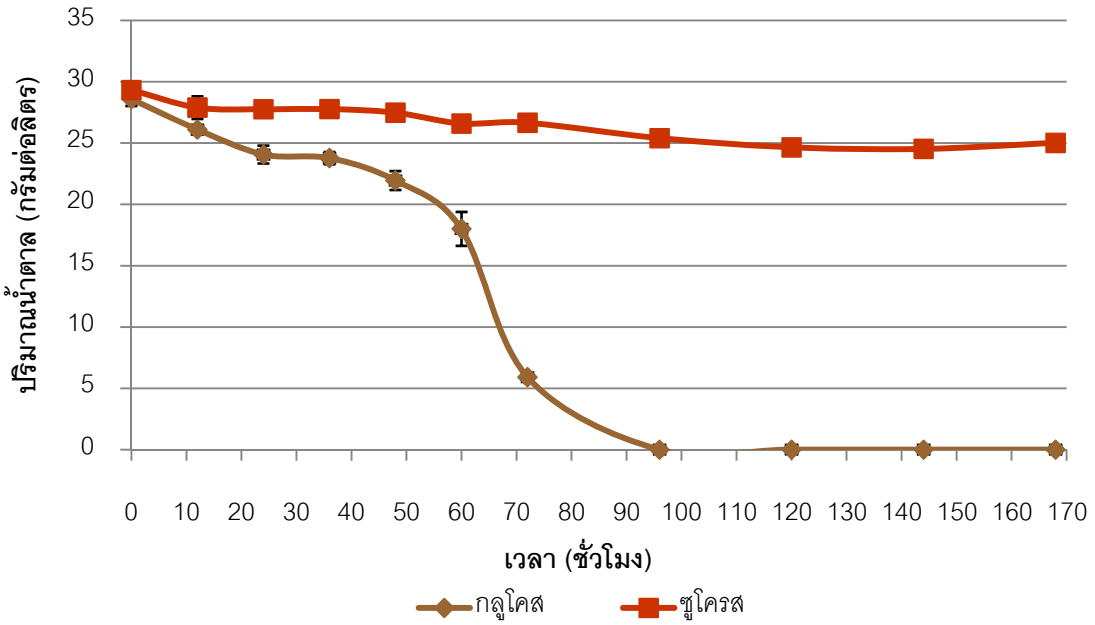
ภาพที่ 4.12 ถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT®A plus, Satorius)



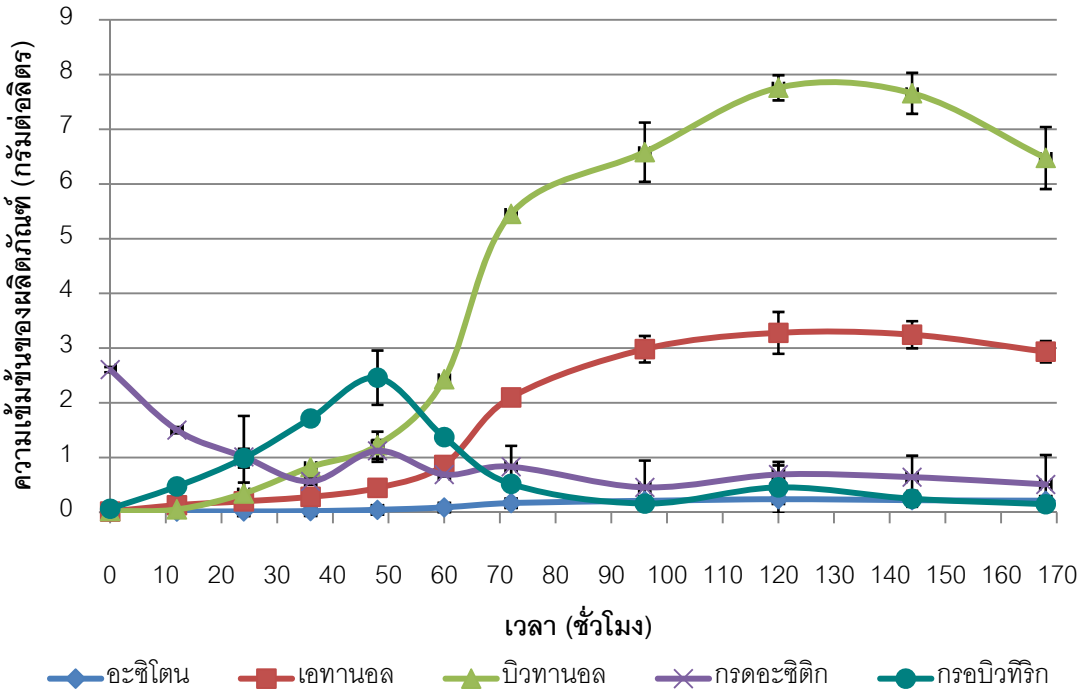
ภาพที่ 4.13 การเจริญของไอโซเลท CG1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.14 ค่าความเป็นกรดด่างในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อหมักด้วยไอโซเลท CG1 เป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.15 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่เหลือจากการหมักของไอโซเลท CG1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรเป็นระยะเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.16 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ไอโซเลท CG1 ผลิตขึ้นในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน

จากแหล่งตัวอย่างในประเทศไทยสามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Clostridium* spp. จากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานและมูลวัวที่เก็บจากจังหวัดสระบุรีและจังหวัดปทุมธานีซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์ เคลื่อนที่ได้ สามารถรีดิวส์ซัลไฟท์และสามารถผลิตตัวทำละลายได้ แต่ไม่รีดิวส์ไนเตรท ไม่สร้างเอนไซม์ lecithinase และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงซึ่งบ่งชี้ในเบื้องต้นว่าไม่เป็นเชื้อก่อโรค (Eisgruber และคณะ, 2000) ได้ 25 ไอโซเลท จากผลการทดลองพบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท ที่สามารถทนต่อบิวทานอลความเข้มข้นสูงสุดที่ 12 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการทนต่อบิวทานอลพบว่า *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 สามารถทนได้เมื่อตัวทำละลายมีความเข้มข้นถึง 20 กรัมต่อลิตรหรือมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร (Lee และคณะ, 2008a) เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาทำการหมักในอาหารสังเคราะห์ในขวดซีรั่มปริมาตร 30 มิลลิลิตรโดยเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้น้ำตาลกลูโคสผสมรวมกับน้ำตาลซูโครสและการใช้น้ำอ้อย ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท CG1 ผลิตตัวทำละลาย (ABE) ได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและน้ำอ้อยความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร คือ 6.08 และ 2.17 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เนื่องจากน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำอ้อย คือ น้ำตาลซูโครส (Walford,

1996) ซึ่งไอโซเลท CG1นำน้ำตาลซูโครสไปใช้ในการผลิตตัวทำละลายได้น้อยกว่าน้ำตาลกลูโคส เมื่อทำการหมักในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตรที่สามารถควบคุมและจัดการระบบได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถผลิตตัวทำละลายบิวทานอลได้มากที่สุด 9.9 กรัมต่อลิตรในอาหาร Modified MS medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมกับน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้คงที่ตลอดการทดลองที่ 5.0 และพบว่าไอโซเลท CG 1 ใช้น้ำตาลกลูโคสหมด ในขณะที่ใช้น้ำตาลซูโครสเพียงเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในขวดซีรั่มที่ไม่มีการใช้น้ำอ้อย นอกจากนี้อายุของกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ใน Log phase (Aleksic, 2009) คือ 36 ชั่วโมงทำให้การผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ขนาด 5 ลิตรสามารถผลิตตัวทำละลายเพิ่มมากขึ้นจากการหมักในขวดซีรั่มปริมาตร 30 มิลลิลิตร 3 เท่า

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรีย *Clostridium* spp. จากตัวอย่างน้ำเสีย ตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และตัวอย่างมูลสัตว์จาก 4 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรีย *Clostridium* spp. จากอาหารสังเคราะห์ Modified MS media ที่มีการเติมพาราอะมิโนเบนโซอิกแอซิดและไบโอตินเป็นวิตามินได้ทั้งสิ้น 83 ไอโซเลท โดย 63 ไอโซเลทคัดแยกได้จากอาหาร Modified MS media ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรจากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร มูลวัวจากโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกรตามพระราชดำริและมูลช้างจากวังช้างอยุธยา และ 20 ไอโซเลทคัดแยกได้จากอาหาร Modified MS media ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรผสมรวมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตรจากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 มูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกร พบว่ามี *Clostridium* spp. เพียง 38 ไอโซเลทจากตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 และมูลวัวจากฟาร์มของเกษตรกรที่มีการสร้างแก๊สภายในขวดซึ่งเป็นการคัดแยกเชื้อ *Clostridium* spp. ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้เบื้องต้น โดยมีคุณสมบัติพื้นฐานด้านลักษณะรูปร่างของเซลล์และสปอร์ที่เป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนและสร้างสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณใกล้ปลายเซลล์ (Sub-terminal) ซึ่งมีเพียง 25 ไอโซเลทที่แสดงคุณสมบัตินี้

การทดสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีช่วยบ่งชี้ถึงการเป็นสายพันธุ์ก่อโรคของเชื้อที่คัดแยกอย่างคร่าว ๆ โดยจากการทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ การรีดิวส์ไนเตรท สร้าง Lecithinase และการรีดิวส์ซัลไฟท์ พบว่าทั้ง 25 ไอโซเลทเคลื่อนที่และสามารถรีดิวส์ซัลไฟท์ ในขณะที่ไม่รีดิวส์ไนเตรท ไม่สร้าง Lecithinase ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อไม่ก่อโรคและผลิตตัวทำละลายได้

การทดสอบความทนต่อตัวทำละลายบิวทานอลพบว่าจาก 25 ไอโซเลทมีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ SG10, SG13, CG1, CS7 และ CS11ที่สามารถทนบิวทานอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตร

การผลิตบิวทานอลจาก 5 ไอโซเลทในขวดซีรั่มพบว่าไอโซเลทที่สามารถผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดคือ CG1 ผลิตได้ 3.67 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลิตเอทานอลและอะซิโตนได้ 2.11 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลิตกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกได้ 0.52 และ 0.67 กรัมต่อลิตร เมื่อนำ

ไอโซเลท CG1 ไปผลิตบิวทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 144 ผลิตบิวทานอลได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 9.9 กรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้น 2 เท่า ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้จนหมดที่ชั่วโมงที่ 96 และค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนคงที่ที่ 5.0 ในขณะที่ผลิตเอทานอลและอะซิโตนได้ 4.28 และ 0.27 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลิตกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกได้ 0.45 และ 0.44 กรัมต่อลิตร

5.2 **ข้อเสนอแนะ**

1. ควรศึกษาแหล่งคัดแยกใหม่ ๆ ที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้นเพื่อค้นหาเชื้อใหม่ ๆ ที่สามารถและผลิตบิวทานอลได้ปริมาณสูง ๆ

2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อให้เชื้อที่คัดแยกได้ผลิตตัวทำละลายได้เต็มประสิทธิภาพ

3. ควรศึกษาแหล่งที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อให้การผลิตเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรุงเทพธุรกิจออนไลน์. 2552. ขาขึ้นอ้อย-น้ำตาล รับราคาตลาดโลกสูงสุดใน 26 ปี. [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://www.bangkokbiznews.com. [2552, สิงหาคม 27].

เกษตรและสหกรณ์, กระทรวง. กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. อ้อยคั้นน้ำ พืชแก้จนของคนระนอง. [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://www.doae.go.th. [2549, พฤษภาคม 8].

ธวัช ตินนังวัฒนะ. 2543. การทำไร่อ้อยยุคใหม่. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์เกษตรอ้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.

อุตสาหกรรม, กระทรวง. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2553. รายงานพื้นที่เพาะปลูกอ้อยและผลผลิตอ้อยปีการผลิต 2553/54. [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://www.ocsb.go.th. [2553, สิงหาคม 31].

อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ. 2548. แบคทีเรียแอนแอโรบส์สกุลคลอสตริเดียม. คลอสตริเดียม เปอร์ฟริงเจนส์ ที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: บริษัท สยาม แอดมินนิสเทรทีฟ แมเนจเมนท์ จำกัด.

ภาษาอังกฤษ

Afschar, A. S., Vaz Rossell, C. E., and Schaller, K. 1990. Bacterial conversion of molasses to acetone and butanol. Applied Microbiology Biotechnology. 34: 168-171.

Aleksic, S. 2009. Butanol Production from Biomass. Master's Thesis, Chemical Engineering Program Faculty of Science Youngstown State University.

Andersch, W., Bahl, H., and Gottschalk, G. 1983. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. Applied Microbiology Biotechnology. 18: 327–332.

Atsumi, S., Hanai, T., and Liao, J. C. 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. Nature. 451: 86-89.

Berezina, O. V., Brandt, A., Yarotsky, S., Schwarz, W. H., and Zverlov, V. V. 2009. Isolation of a new butanol-producing *Clostridium* strain: high level of hemicellulosic activity and structure of solventogenesis genes of a new

Clostridium saccharobutylicum isolate. Systematic and Applied Microbiology. 32: 449-459.

Bowles, L. K., and Ellefson, W. L. 1985. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology. 50: 1165–1170.

Brekke, K. 2007. Butanol–an energy alternative? Ethanol Today. [Online] sources: http://www.ethanoltoday.com and http://www.ethanol.org. [2007, March].

Calam, C. T. 1980. Isolation of *Clostridium acetobutylicum* strains producing butanol and acetone. Biotechnology Letters. 2(3): 111-116.

Campos, E. J., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2002. Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA 101. Applied Biochemistry and Biotechnology. 98-100(1-9): 553-561.

Cornillot, E., and Soucaille, P. 1996. Solvent forming genes in *Clostridia*. Nature. 380: 489.

Davis, S. E., and Morton, S. A. 2008. Investigation of ionic liquids for the separation of butanol and water. Separation Science and Technology. 43: 2460-2472.

Dürre, P. 2007. Biobutanol: an attractive biofuel. Biotechnology Journal. 2(12): 1525-1534.

Dürre, P. 2008. Fermentative butanol production–bulk chemical and biofuel. Annals of the New York Academy of Sciences. 1125: 353-362.

Eisgruber, H., Schalch, B., Sperner, B., and Stolle, A. 2000. Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food. International Journal of Food Microbiology. 57: 135–140.

Ezeji, T. C., Karcher, P. M., and Blaschek, H. P. 2006. Butanol production from corn. Alcoholic Fuels: Fuels for Today and Tomorrow. Edited by Minteer, S. D. New York, NY: Taylor & Francis Group; p. 99-122.

Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2004. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. The Chemical Record. 4(5): 305-314.

Ezeji, T., Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2007. Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. Process Biochemistry. 42(1): 34-39.

George, H. A., and Chen, J. S. 1983. Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (synonym, C. *butylicum*). Applied Environmental Microbiology. 46(2): 321-327.

Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M., and Chou, C. P. 2009. Metabolic pathways of *Clostridia* for producing butanol. Biotechnology Advances. 6: 764-781.

Gholizadeh, L. 2009. Enhanced butanol production by free and immobilized *Clostridium* sp. cells using butyric acid as Co-Substrate. Master's Thesis, Biotechnology (Bioprocess Engineering – Biofuels). School of Engineering University College of Borås, Sweden.

Girbal, L., and Soucaille, P. 1998. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Trends in Biotechnology. 16(1): 11–16.

Hansch, C., Leo, A., and Hoekman, D. 1995. Exploring QSAR hydrophobic, electronic and steric constants. American Chemical Society. 2: 9

Hansen, A. C., Zhang, Q., and Lyne, P. W. L. 2005. Ethanol diesel fuel blends – a review. Bioresource Technology. 96(3): 277-285.

Hartmanis, M. G. N., Klason, T., and Gatenbeck, S. 1984. Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. Applied Microbiology Biotechnology. 47: 1277–1283.

Hermann, M., Fayolle, F., Marchal, R., Podvin, L., Sebald, M., and Vandecasteele, J. 1985. Isolation and characterization of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology. 50(5): 1238-1243.

Hess, G., 2006. BP and DuPont plan 'Biobutanol' in: Chemical & Engineering News 28 (6): 9.

Hipolito, C. N., Crabbe, E., Badillo, C. M., Zarrabal, O. C., Mora, M. A. M., Flores, G. P., Cortazar M. de A. H., and Ishizaki, A. 2008. Bioconversion of industrial

wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutyllacetonicum* N1-4 (ATCC13564). Journal of Cleaner Production. 16(5): 632-638.

Huber, G. W., Sara, I., and Corma, A. 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts and engineering. Chemical Reviews. 106(9): 4044–4098.

Jones, D. T., and Woods, D. R. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiological reviews. 50(4): 484-524.

Karakashev, D., Thomsen, A. B., and Angelidaki, I. 2007. Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid eEnergy carriers from biomass. Biotechnology Letters. 29(7): 1005-1012.

Knoshaug, E. P., and Zhang, M. 2009. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. Applied Biochemistry Biotechnolology. 153: 13–20.

Lee, S. F., Forsberg, C. W., and Gibbins, L. N. 1985. Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology. 50(4): 1068–1076.

Lee, S. M., Cho, M. O., Park, C. H., Chung, Y. C., Kim, J. H., Sang, B. I., and Um, Y. 2008b. Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB8052 with supplementary butyrate. Energy and Fuels. 22(5): 3459-3464.

Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., and Jung, K. S. 2008a. fermentative butanol production by *Clostridia*. Biotechnology and Bioengineering. 101(2): 209-228.

Lenz, T. G., and Moreira, A. R. 1980. Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation. Industrial and Engineering Chemistry Product and Research and Development. 19(4): 478-483.

Lin, Y. L., and Blaschek, H. P. 1983. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth Applied and Environmental Microbiology. 45(3): 966-973.

Mansur, M. C., O' Donnell, M. K., Rehmann, M. S., and Zohaib, M. 2010. ABE Fermentation of Sugar Cane in Brazil. Senior Design Report (CDE), Department of Chemical & Biomolecular Engineering, School of Engineering and Applied Science, University of Pennsylvania.

Mes-Hartree, M., and Saddler, J. N. 1982. Butanol production of *Clostridium acetobutylicum* grown on sugars found in hemicellulose Hydrolysates. Biotechnology Letters. 4(4): 247-252.

Mitchell, W. J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by *Clostridia.* Advances in Microbial Physiology. 39:31–130.

Montoya, D., Spitia, S., Silva, E., and Schwarz, W. H. 2000 Isolation of mesophilic solvent-producing *Clostridia* from Colombian sources: physiological characterization, solvent production and polysaccharide hydrolysis. Journal of Biotechnology 79(2): 117–126.

Nishio, N., Biebl, H., and Meiners, M. 1983. Effect of pH on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a minimum medium. Journal of General Microbiology. 61: 101-104.

Niven, R. K. 2005. Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 9(6): 535-555.

O' Brien, R. W., and Morris, J. G., 1971. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. Journal of General Microbiology. 68: 307-318.

Papoutsakis, E. T., and Bennett, G. N. 1999. Molecular regulation and metabolic engineering of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. Bioprocess Technology. 24: 253–279.

Park, C. H., Okos, M. R., and Wankat, P. C. 1989. Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell trickle bed reactor.Biotechnology and Bioengineering. 34(1): 18-29.

Parekh, M., and Blaschek, H. P. 1999. Butanol production by hypersolvent-producing mutant *Clostridium beijerinckii* BA101 in corn steep water medium containing maltodextrin. Biotechnology Letters. 21(1): 45-48.

Pelczar, M J., Bard, R. C., Burnett, G. W., Conn, H. J., Demoss, R. D., Euans, E. E., Weiss, F. A., Jennison, M. W., Meckee, A. P., Riker, A. J., Warren, J., and Weeks, O. B. 1957. Society of American bacteriology. Manual of Microbiological methods. McGraw Hill Book Company, Inc. New York.

Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J., and Gaudin, C. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. Nov., a cellulolytic, mesophilic species from decayed grass. International Journal of Systematic Bacteriology. 34: 155-159.

Quratulain, S., Qadeer, M. A., Chaudhry, M. Y., and Kausar, A. R. 1995. Development and characterization of butanol-resistant strain of *Clostridium acetobutylicum* in Molasses Medium. Folia Microbiologica. 40(5): 467-471.

Qureshi, N., and Blaschek H. P. 2000. Economics of fermentation using hyper butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. Transactions of the Institution of Chemical Engineers. 78: 139-144.

Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2001. ABE Production from corn: a recent economic evaluation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 27: 292-297.

Qureshi, N., and Blaschek, H. P. 2005. Butanol production from agricultural biomass. Food Biotechnology. 525-551.

Qureshi, N., Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2007. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. Bioprocess and Biosystems. Engineering. 30(6): 419-427.

Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., and Blaschek, H.P. 2008. Butanol Production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. Bioresource Technology. 99(13): 5915-5922.

Rhodehamel, E. J., and Harmon, S. M. 1998. Chapter 16, *Clostridium perfringens*, Bacteriological Analytical Manual Online, 8th edition. U.S.F.D.A., Center for food safety and applied nutrition.

Sánchez, O. J., and Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology. 99: 5270-5295.

Shahidi, S. A., and Ferguson, A. R. 1971. New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. Applied and Environmental Microbiology. 21(3): 500-506.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., and Hall, S. J. 1995. Principles of Fermentation Technology (2^{nd} edition). Oxford: Elsevier Science Ltd.

Sukhumavasi, J., Ohmiya, K., Shimizu, S., and Ueno, K. 1988. *Clostridiurn josui* sp. nov., a cellulolytic, moderate thermophilic species from Thai compost. International journal Of Systematic Bacteriology. 38(2): 179-182.

Syed, Q. U. A., Nadeem, M., and Nelofer, R. 2008. Enhanced butanol production by mutant strains of *Clostridium acetobutylicum* in molasses medium. Turkish Journal of Biochemistry. 33(1): 25-30.

Szulczyk, K., R. 2010. Which is a better transportation fuel – butanol or ethanol? International Journal of Energy and Environment. 1(1): 1-12.

Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., and Sonomoto, K. 2005. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. Journal of Biotechnology. 120: 197-206.

Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Denduangbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. Anaerobe. 14: 109-117.

Wackett, L. P. 2008. Biomass to fuels via microbial transformations. Current Opinion in Chemical Biology. 12: 187-193.

Walford, S. 1996. Composition of cane juice. Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association. 70: 265-266.

Weyer, E. R., and Rettger, L. F. 1927. A comparative study of six different strains of the organism commonly concerned in large-scale production of butyl alcohol and acetone by the biological process. The Journal of Bacteriology. 14(6): 399–424.

Woods, D. R. 1995. The genetic engineering of microbial solvent production. Trends in Biotechnology. 13(7): 259–264.

Zverlov, V. V., Berezina, O. Velikodvorskaya, G. A., and Schwarz, W. H. 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for birefinary. Applied Microbiology and Biotechnology. 71(5): 587-597.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Modified MS medium

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$)	0.1 กรัม
ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2 กรัม
กรดอะซิติก (Acetic acid)	2.2 มิลลิลิตร
Para-aminobenzoic acid (PABA)	8 มิลลิกรัม
Biotin	0.08 มิลลิกรัม
Resazurin	1 มิลลิลิตร (จาก stock 1 กรัมต่อลิตร)
น้ำตาลกลูโคส	30 กรัม
น้ำตาลซูโครส	30 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

นำไปต้มจนอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน เทใส่ขวดซีรั่มปิดด้วยจุกยาง จากนั้นไล่ออกซิเจนด้วยการเติมแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 15 นาที ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อปล่อยอาหารให้เย็นจากนั้นเติม 30x cysteine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ สำหรับอาหาร modified MS agar ให้เติมวุ้นผงเพิ่ม ไม่เติม 30x cysteine หลังจากอาหารแข็งก่อนนำไปใช้ให้นำจานอาหารวางทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic chamber) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนของปริมาณน้ำตาลเติมตามสูตรอาหารที่เลือกไว้

2. อาหารกึ่งแข็ง Motility test medium

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Fluka โดยชั่ง Motility medium 22 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บในที่มืด

3. อาหารเหลว Nitrate broth

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่ง Nitrate medium 9 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4 อาหารแข็ง SFP agar ที่มี 50% egg yolk emulsion

4.1 Base layer: ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่ง SFP agar 47 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 900 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติม 50 เปอร์เซนต์ egg yolk emulsion (วิธีเตรียมจาก Bacteriological Analytical Manual (BAM)) Antimicrobic Vial P 10 มิลลิลิตรและ Antimicrobic Vial K 4.8 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

4.2 Cover layer: ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco โดยชั่ง SFP agar 47 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ไม่ต้องเติม 50 เปอร์เซ็นต์ egg yolk emulsions

5. อาหารแข็ง Differential Reinforced Clostridial Medium (DRCM)

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Fluka โดยชั่ง DRCM 30 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สีสำหรับย้อมแกรม

1.1 Modified Hucker's crystal violet ammonium oxalate

Solution A: ชั่ง crystal violet 2 กรัมละลายใน เอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

Solution B: ชั่ง ammonium oxalate 0.8 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสม Solution A และ solution B ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงกรองก่อนใช้ เก็บในขวดสีชา

1.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95%

1.3 Gram's iodine

ชั่ง Potassium iodide (KI) 2 กรัม และ iodine crystal 1 กรัมบดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรเก็บไว้เป็น stock ในขวดสีชา เมื่อจะใช้นำ stock 1 ส่วนไปผสมกับน้ำ 2 ส่วน เก็บในขวดสีชา

1.4 Gram's safranin

ชั่ง safranin O มา 2 กรัมละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สีสำหรับย้อมสปอร์

2.1 สี malachite green 5%

ชั่ง Malachite green 5 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 สี safranin 0.5%

ชั่ง safranin O มา 0.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายทดสอบความสามารถรีดิวซ์ไนเตรท

3.1 สารละลาย A

sulfanilic acid	0.8 กรัม
5 N acetic acid	100 มิลลิลิตร

3.2 สารละลาย B

Alpha-naphtylamine	0.5 กรัม
5 N Acetic acid	100 มิลลิลิตร

ละลาย sulfanilic acid และ alpha-naphtylamine ใน 5 N acetic acid โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย สำหรับสารละลาย A และ B ตามลำดับ

4. สารละลาย 30x cysteine

L-cysteine	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลตร

ทำ Stock solution ใส่ขวดซีรั่มนำไปไล่แก๊สออกซิเจน (degas) ด้วยการเติมแก๊สไนโตรเจน 99.995 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 15 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. สารละลาย resazurin

resazurin	1 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลตร

เก็บเป็น Stock solution

6. 50% egg yolk emulsion

1. ล้างไข่ให้สะอาด แช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซนต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. เจาะไข่ด้านแหลมด้วย forceps ปลอดเชื้อ เทไข่ขาวออกให้หมด

3. เทไข่แดงใส่ลงในกระบอกตวงปลอดเชื้อ เติมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปลอดเชื้อลงไปให้เท่ากับปริมาตรของไข่แดง ใช้ปิเปตคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1.ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาล สำหรับนำไปคำนวณปริมาณน้ำตาล

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสความเข้มข้น 5% น้ำหนักต่อปริมาตรเป็น stock mix sugar

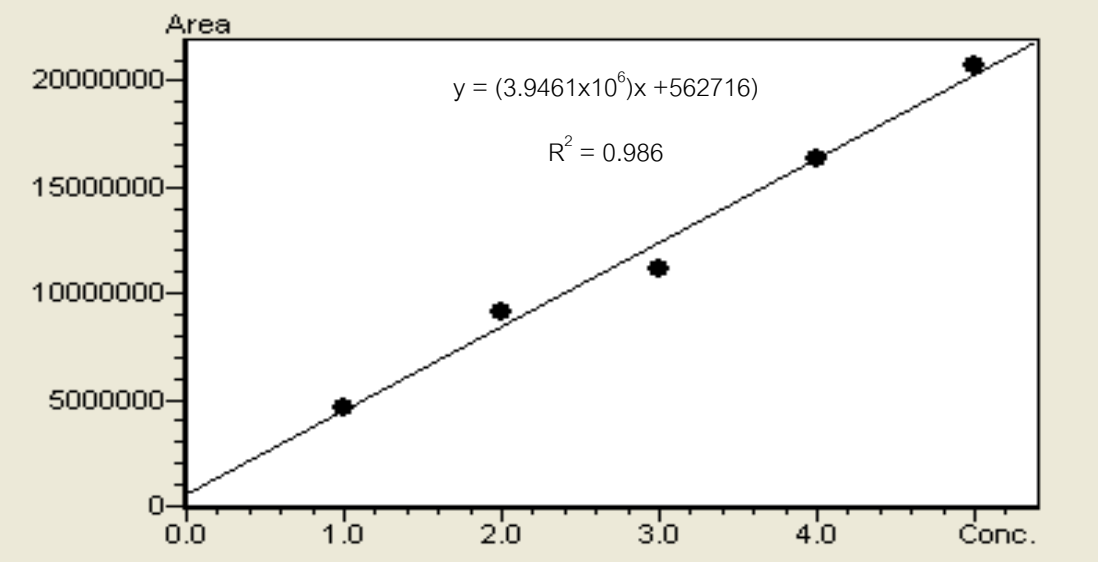
(2) ปิเปต Stock mix sugar จากข้อ 1 ผสมกับน้ำกลั่นเพื่อทำเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางด้านล่าง

ตารางที่ ค-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานผสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส

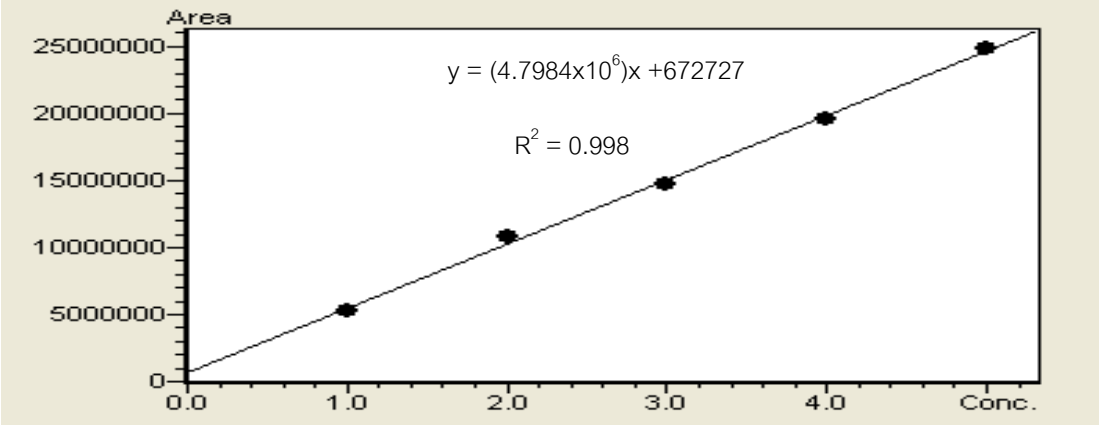
ความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร)	Stock mix sugar (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
1	200	800
2	400	600
3	600	400
4	800	200
5	1000	0

(3) ดูดสารละลายผสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสที่แต่ละความเข้มข้นใส่ลง vial ปริมาตร 560 ไมโครลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

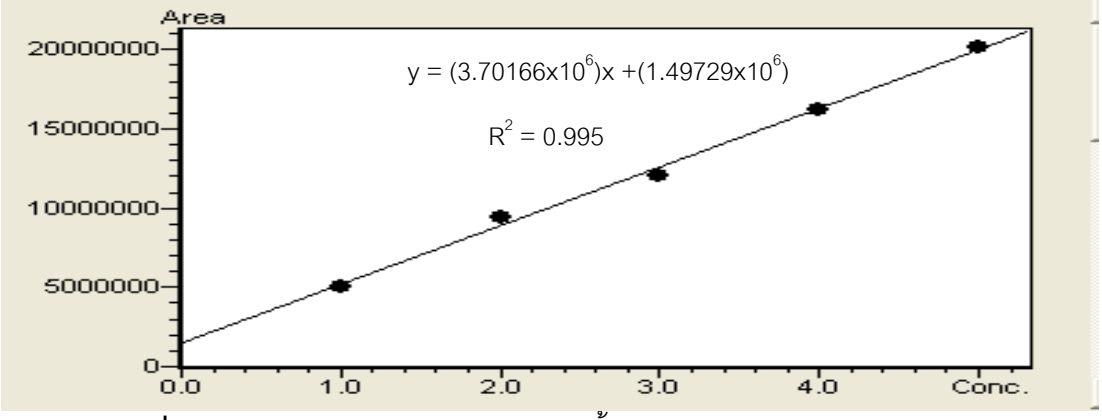
(4) เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของสารละลายผสมของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตสจะได้กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส



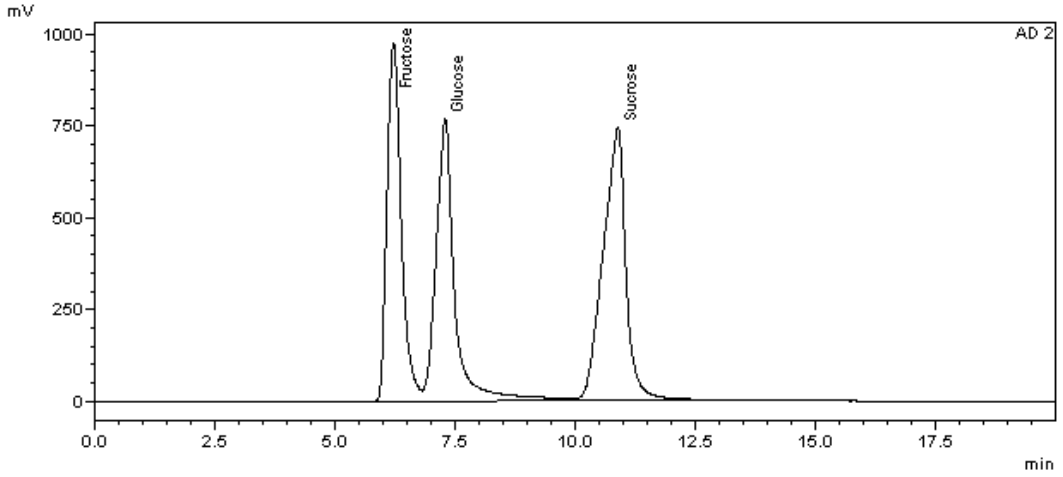
ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครส



ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลฟรุกโตส



ภาพที่ ค-4 โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสมาตรฐาน 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

2.ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกสำหรับนำไปคำนวณปริมาณสารทั้ง 5 ตัว

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็น Stock mix solvent

ตารางที่ ค-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น Stock mix solvent (กรัมต่อลิตร)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทิริก (กรัมต่อลิตร)
5	314.07	316.77	310.27	238.81	263.05

(2) ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้เป็น Stock mix solvent

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของ n-propanol ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็น Internal standard

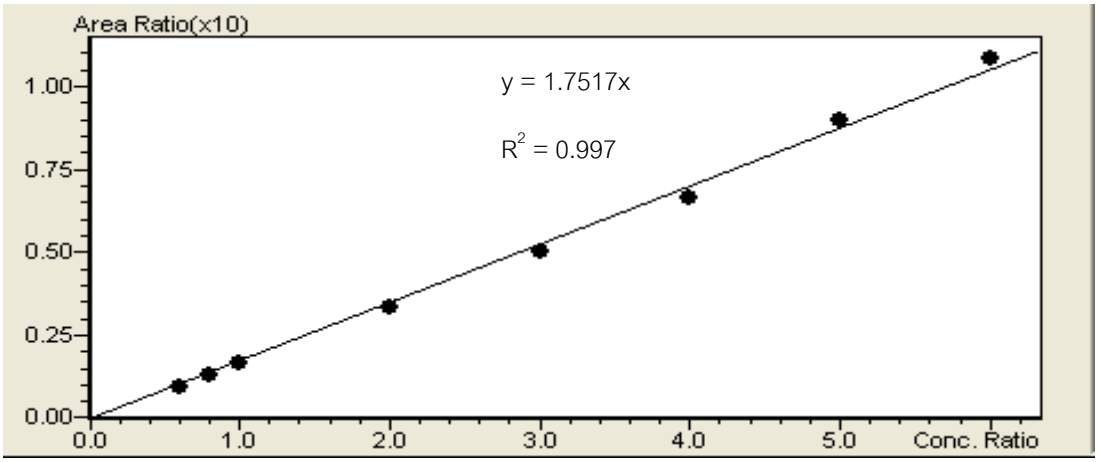
(4) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกที่เข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ตารางแสดง ค-3 ปริมาณสาร Stock mix solvent ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสารทั้ง 5 ตัวของตัวอย่าง

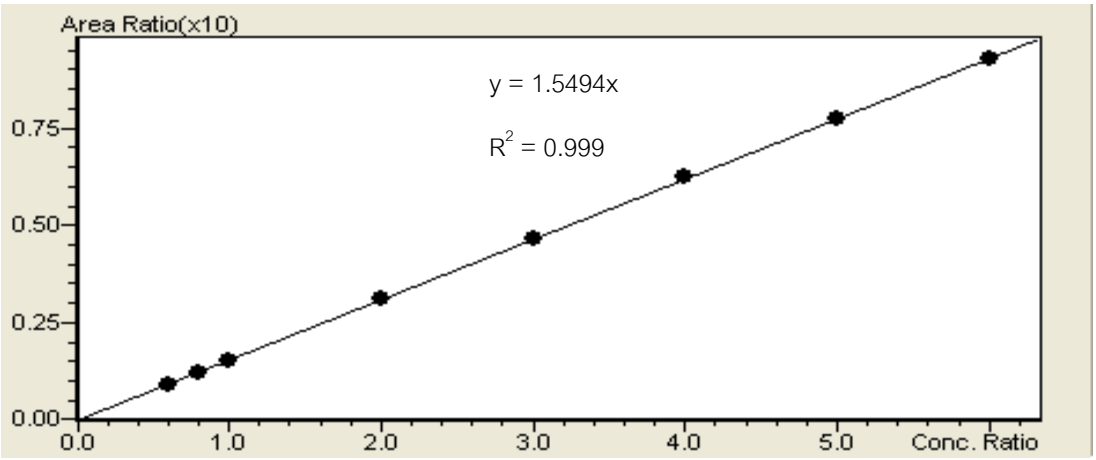
ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	Stock mix solvent (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	n-propanol (ไมโครลิตร)
0	0	560	140
0.2	28	532	140
0.4	56	504	140
0.6	84	476	140
0.8	112	448	140
1.0	140	420	140
2.0	280	280	140
3.0	420	140	140
4.0	560	0	140

(5) ดูดสารละลายผสมของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกที่แต่ละความเข้มข้นใส่ลง Vial ปริมาตร 560 ไมโครลิตรผสมกับ n-propanol 140 ไมโครลิตรเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 5 ตัว

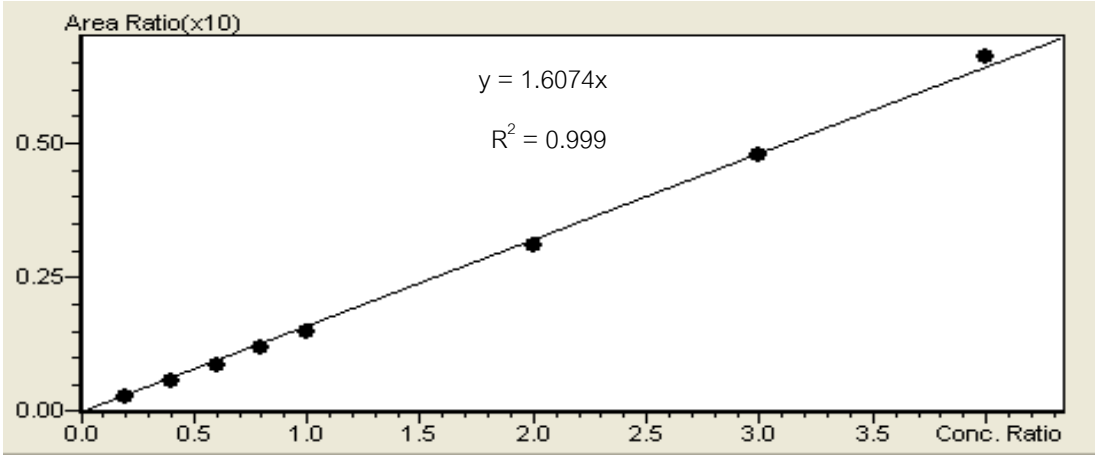
(6) เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของสารละลายผสมสารทั้ง 5 ตัว จะได้กราฟมาตรฐานของของอะซิโตน เอทานอล บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก



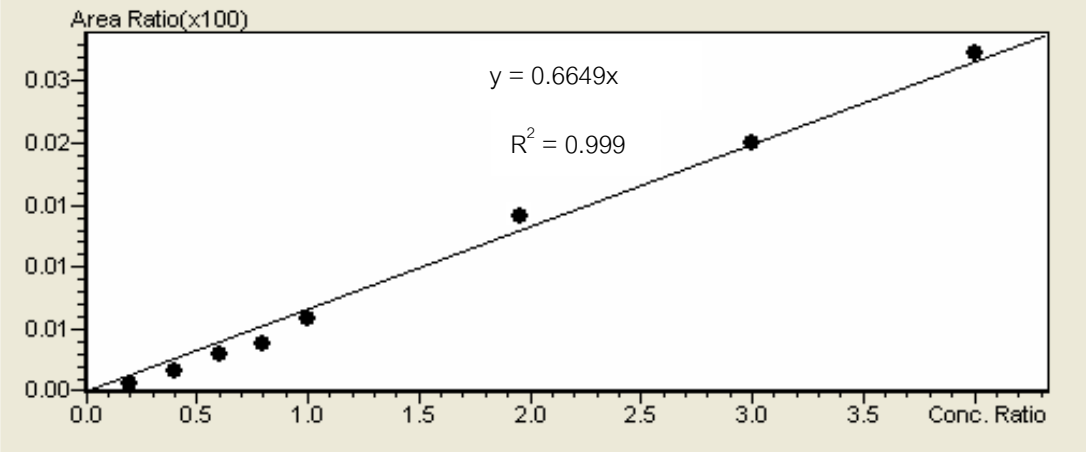
ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานของอะซิโตน



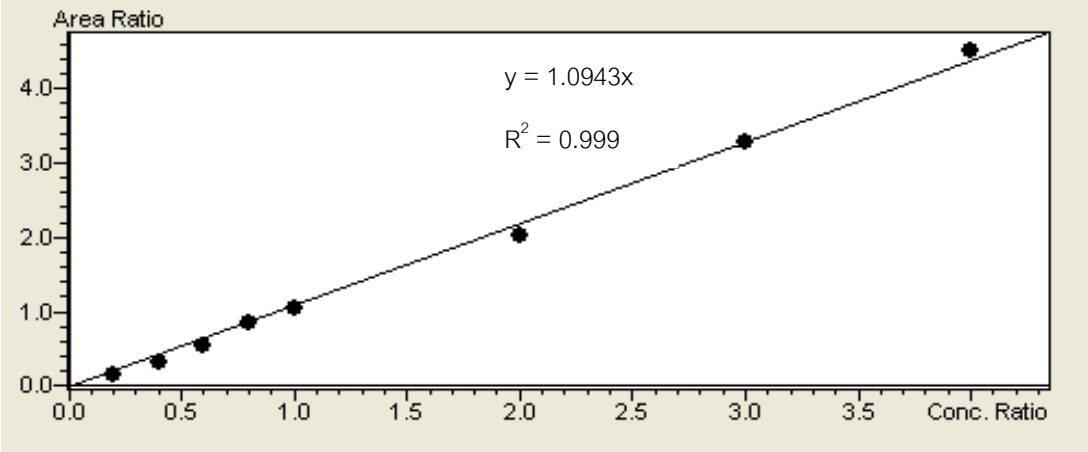
ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐานของเอทานอล



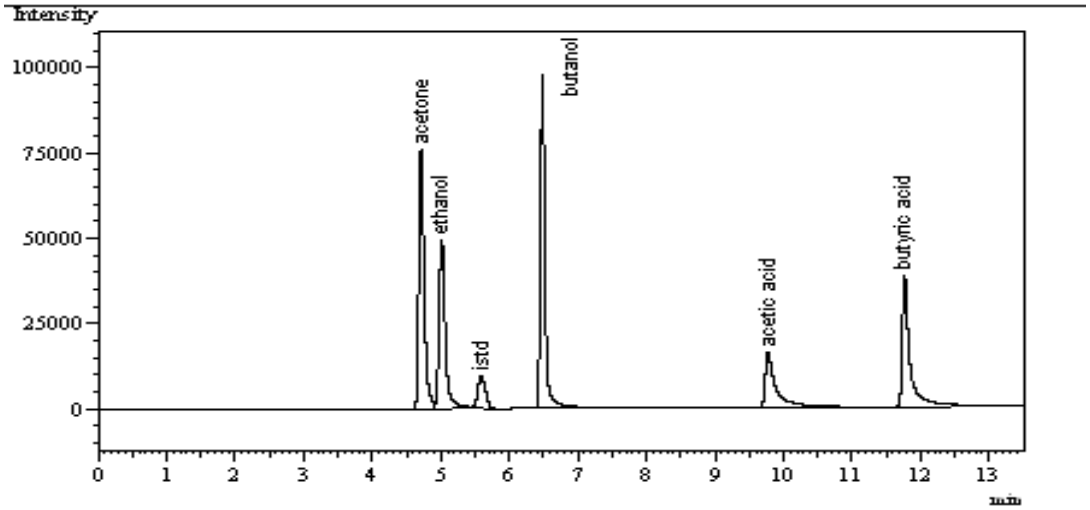
ภาพที่ ค-7 กราฟมาตรฐานของบิวทานอล



ภาพที่ ค-8 กราฟมาตรฐานของกรดอะซิติก



ภาพที่ ค-9 กราฟมาตรฐานของกรดบิวทิริก



ภาพที่ ค-10 โครมาโทแกรมของอะซิโตน เอทานอล internal standard บิวทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมาตรฐาน 4 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรรณธิภา ส่งเสริมพานิช เกิดเมื่อวันที่ 6 กันยายน พ.ศ. 2528 ณ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ระดับปริญญาตรีสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2550 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้มีการนำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนแบบโปสเตอร์ในโครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับนานาชาติ ครั้งที่ 22 วันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง หัวข้อเรื่อง ANAEROBIC BACTERIA FROM COW DUNG FOR BIOFUEL APPLICATIONS ในงาน The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “International Conference on Biotechnology for Healthy Living “ และในโครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 20 วันที่ 2-3 กุมภาพันธ์ 2554 ณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา หัวข้อเรื่องการคัดแยกแบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและมูลสัตว์สำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ในงาน 20th National Grad Research Conference และนำเสนอแบบบรรยายในหัวข้อเรื่อง SCREENING OF ANAEROBIC BACTERIA FROM COW DUNG IN THAILAND FOR BIOFUEL PRODUCTION ในงาน 15th Biological Science Graduate Congress (2010), University of Malaya ประจำปี 2553 ระหว่างวันที่ 15-17 ธันวาคม 2553