อิทธิพลของสายพันธุ์คลอสตริเดียมและแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักบิวทานอล

นายภาณุพงศ์ ทองขาว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5470324621

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF CLOSTRIDIUM STRAINS AND NITROGEN SOURCES ON BUTANOL FERMENTATION

Mr. Panupong Thongkhaw

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อิทธิพลของสายพันธุ์คลอสตริเดียม และแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักบิวทานอล
โดย	นายภาณุพงศ์ ทองขาว
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….....คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…….....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. บรรเจิด จงสมจิตร)

…….....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล)

…….กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

…….กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันเชิง สิทธิกิจโยธิน)

ภาณุพงศ์ ทองขาว: อิทธิพลของสายพันธุ์คลอสตริเดียมและแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักบิวทานอล (EFFECTS OF CLOSTRIDIUM STRAINS AND NITROGEN SOURCES ON BUTANOL FERMENTATION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ.ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, 111 หน้า.

น้ำอ้อยถูกใช้ในการผลิต ABE (อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล) โดยใช้เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 และ *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ในการศึกษาการเปรียบเทียบกระบวนการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่ 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ให้ความเข้มข้นตัวทำละลายสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีกสองสายพันธุ์ เชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 และ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ให้ตัวทำละลายรวม เป็น 17.46 และ 14.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่สภาวะเหมาะสมที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ให้ปริมาณตัวทำละลาย (7.09 กรัมต่อลิตร) ที่สภาวะเหมาะสมที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร

การศึกษาอิทธิพลของไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด, แอลไลซีน และกากผงชูรส) และไนโตรเจนอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) ร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตตัวทำละลายโดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ในกระบวนการหมักแบบกะที่อุณหภูมิ 35 ^{O}C และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 สำหรับอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียว พบว่า กระบวนการหมักที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้การผลิตตัวทำละลาย 16.06 กรัมต่อลิตร โดยสูงกว่ากระบวนการหมักที่ใช้แอลไลซีน (11.25 กรัมต่อลิตร) และกากผงชูรส (6.71 กรัมต่อลิตร) กากผงชูรสช่วยในการสร้างกรด และมวลเซลล์ ในขณะที่ยีสต์สกัด และแอลไลซีน ช่วยส่งเสริมการรสร้างตัวทำละลาย เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนร่วมกัน (ยีสต์สกัด/ แอมโมเนียมอะซิเตต หรือแอลไลซีน / แอมโมเนียมอะซิเตต) ในอาหารสูตรซับซ้อน พบว่า ปริมาณตัวทำละลายรวม การเจริญเติบโตของเซลล์ และอัตราการผลิตตัวทำละลายรวม สามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเติมแอมโมเนียมอะซิเตตร่วม ไม่มีผลต่อกระบวนการหมักที่ใช้กากผงชูรส การใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมอะซิเตต ที่สภาวะเหมาะสมให้ปริมาณตัวทำละลายรวมสูงสุด 21.51 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วยบิวทานอล 15.83 กรัมต่อลิตร, อะซิโตน 5.08 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 0.6 กรัมต่อลิตร) โดยมีร้อยละผลได้ตัวทำละลายรวม 35.99 และอัตราการผลิตตัวทำละลาย (Yp/s) 0.166 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยจำเพาะ ส่วนอัตราการผลิตกรดเฉลี่ยจำเพาะ และอัตราการผลิตตัวทำละลายเฉลี่ยจำเพาะ เป็น 0.041 ชั่วโมง$^{-1}$, 0.03 และ 0.293 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ตามลำดับ

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2555 .....

5470324621: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS: BUTANOL / SUGARCANE JUICE / CLOSTRIDIUM / FERMENTATION

PANUPONG THONGKHAW: EFFECTS OF CLOSTRIDIUM STRAINS AND NITROGEN SOURCES ON BUTANOL FERMENTATION. ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL, Ph.D., 111 pp.

Sugarcane juice was used as a substrate to produce ABE (acetone, butanol and ethanol) using *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 and *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BAA 117. In a comparative study of fermentation using initial reducing sugar concentrations of 60 and 80 g/L, *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 yielded the highest solvent concentration compared with other two strains. With *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 and *C. acetobutylicum* ATCC 4259, the optimal solvent production was obtained as 17.46 and 14.09 g/L, respectively in the media with sugar content at 60 g/L, whereas *C. acetobutylicum* ATCC 824 provided the optimal solvent production (7.09 g/L) in media with sugar content at 80 g/L.

The effect of organic nitrogen (Yeast extract, L-lysine and Ajinomoto waste liquor) and inorganic nitrogen (ammonium acetate) combination on the cell growth and solvent production by *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 was studied in a batch fermentation at 35 ^{O}C and pH = 5.0. For the effect of single nitrogen source, it revealed that the fermentation using yeast extract as a nitrogen source resulted in 16.06 g/L solvent production, which was higher than those obtained in fermentations using L-lysine (11.25 g/L) and Ajinomoto waste liquor (6.71 g/L). Ajinomoto waste liquor favored acid formation and cell growth, whereas the yeast extract and L-lysine enhanced solvent production. When co-nitrogen sources (yeast extract/ ammonium acetate or L-lysine/ ammonium acetate) were used in the complex media, total solvent, cell growth and solvent production rate could be raised significantly. Addition of ammonium acetate has no effect on the fermentation using Ajinomoto waste liquor. By using sugarcane juice medium at optimal sugar concentration (60 g/L) with yeast extract and ammonium acetate, the total solvent of 21.51 g/L (composed of 15.83 g/L butanol, 5.08 g/L acetone and 0.6 g/L ethanol) with the conversion yield (Yp/s) of 35.99 % and 0.166 g/ L•h production rate was obtained. The average specific growth rate, specific rate of acid formation and specific rate of solvent formation were 0.041, 0.03 and 0.293 g/g•h, respectively.

Department: Chemical engineering Student's Signature .....

Field of Study: Chemical engineering Advisor's Signature .....

Academic Year: 2012

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ อิทธิพลของสายพันธุ์คลอสตริเดียม และแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักบิวทานอล สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือที่ดีจากบุคคลต่างๆ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย และให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเป็นรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รศ.ดร.บรรเจิด จงสมจิตร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพินธ์ และรศ.ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และผศ.ดร.วันเชิง สิทธิกิจโยธิน กรรมการสอบวิทยานิพินธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านข้อมูลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายสุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ณ
บทที่ 1 บทนำ..... **1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 3
1.3 ขอบเขตการวิจัย..... 3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ..... 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยว..... 5
2.1 ประวัติการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล..... 5
2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก..... 5
2.3 กระบวนการทางชีวเคมีของกระบวนการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล..... 7
2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล..... 10
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก..... 11
2.5.1 แหล่งคาร์บอนในการหมัก..... 11
2.5.2 แหล่งไนโตรเจนในการหมัก..... 11
2.5.2.1 แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน..... 11
2.5.2.2 แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน..... 12
2.5.3 แร่ธาตุ..... 15
2.5.4 วิตามิน..... 17
2.5.5 ความเข้มข้นของน้ำตาล..... 18
2.5.6 การสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 18
2.5.7 การ ทำ heat Shock..... 18
2.5.8 อุณหภูมิของการหมัก..... 18

หน้า

2.5.9 อิทธิพลของการกวน 19
2.5.10 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 19
2.5.11 การยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ 19
2.5.12 สูตรอาหาร 20
2.6 การใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ 21
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 22
3.1 อุปกรณ์ 22
3.2 เคมีภัณฑ์ 22
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 23
3.4 กระบวนการหมัก 24
3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก 24
3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อระดับขวดเขย่าก่อนลงถังหมัก 24
3.4.3 กระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 1 ลิตร 24
3.5 ศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล 25
3.6 ศึกษาผลของชนิดของแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณบิวทานอล 25
3.6.1 ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจนชนิดเดียว 25
3.6.2 ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ในโตรเจนร่วมกับอนินทรีย์ในโตรเจน 25
3.7 การเตรียมตัวอย่างน้ำหมักก่อนทำการวิเคราะห์ 25
3.8 การวิเคราะห์ปริมาณ กรดบิวทีริก กรดอะซิติก บิวทานอล เอทานอล และ
อะซิโตน 26
3.9 การวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์ 26
3.10 การวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาล 26
3.10.1 วิธี ดีเอ็นเอส (DNS) 27
3.10.2 วิธี การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง วายเอสไอ (YSI) 27
3.11การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง 30
4.1 ศึกษาความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกะของสายพันธุ์
จุลินทรีย์ 30
4.1.1 การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 30

หน้า

4.1.2 การผลิตบิทานอลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259..... 39
4.1.3 การผลิตบิทานอลของเชื้อ *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BA117..... 48
4.2 ศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล จากเชื้อครอสต-ริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ..... 59
4.2.1 การใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ชนิดเดียว..... 59
4.2.2 การใช้แหล่งไนโตรเจนรูปอินทรีย์ร่วมกับรูปอนินทรีย์..... 71
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... **83**
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 83
5.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมต่อคลอสตริเดียมสามสายพันธุ์ 83
5.1.2 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว..... 83
5.1.3 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์..... 85
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 86
รายการอ้างอิง..... **81**
ภาคผนวก..... **87**
ภาคผนวก ก สูตรสารอาหารในการหมัก..... 93
ภาคผนวก ข การคำนวณ..... 94
ภาคผนวก ค ข้อมูลทางการทดลอง และกราฟมาตรฐาน..... 96
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... **111**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	แสดงปริมาณ และราคานำเข้าน้ำมันดิบในปี พ.ศ. 2550-2554	1
1.2	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของบิวทานอลกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น	2
2.1	แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก จุลินทรีย์สายพันธุ์	10
2.2	แสดงกรดอะมิโนที่พบในยีสต์สกัด	14
2.3	แสดงกรดอะมิโนที่พบนากากผงชูรส	15
2.4	แสดงความเข้มข้นของแร่ธาตุที่นิยมเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
2.5	แสดงองค์ประกอบของธาตุต่างๆที่พบใน จุลินทรีย์	20
4.1	ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะ *C. acetobutylicum* ATCC 824	38
4.2	ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะ *C. acetobutylicum* ATCC 4259	47
4.3	ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117	57
4.4	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในกระบวนการหมักแบบกะ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117	70
4.5	ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในกระบวนการหมักแบบกะ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117	82
ก	สารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย	93
ค 1.1	ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. acetobutylicum* ATCC 824 สูตรอาหารสูตร 1	96
ค 1.2	ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร *C. acetobutylicum* ATCC 824 สูตรอาหารสูตร 1	97
ค 1.3	ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. acetobutylicum* ATCC 4259 สูตรอาหารสูตร 1	98
ค 1.4	ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร *C. acetobutylicum* ATCC 4259 สูตรอาหารสูตร 1	99

ตารางที่ หน้า

ค 1.5 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 1..... 100

ค 1.6 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 1..... 101

ค 1.7 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 2..... 102

ค.1.8 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 3..... 103

ค 1.9 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 4..... 104

ค 1.10 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร*C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 5..... 105

ค 1.11 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 6..... 106

ค 1.12 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร*C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 สูตรอาหารที่ 7..... 107

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ภาพแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แบบกะ (bath).....	7
2.2	แสดงกระบวนการการสร้าง อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล	
4.1	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	32
4.2	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 …....	33
4.3	ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	34
4.4	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	35
4.5	ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. aceto-butylicum* ATCC 824.....	36
4.6	ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	36
4.7	การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น.....	37
4.8	ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259.....	41
4.9	ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259	42
4.10	ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259.....	43
4.11	ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259.....	44
4.12	ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259	45
4.13	ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum*	

รูปที่ หน้า

ATCC 4259..... 45
4.14 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น..... 46
4.15 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 51
4.16 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 52
4.17 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 53
4.18 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 54
4.19 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 55
4.20 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117..... 55
4.21 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น..... 56
4.22 การเปรียบเทียบปริมาณบิวทานอล และตัวทำละลายรวมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดต่อความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกะ..... 58
4.23 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร..... 62
4.24 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยโดยใช้ยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร..... 63
4.25 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 64
4.26 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60กรัมต่อลิตร..... 65
4.27 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย น้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60..... 66

รูปที่ หน้า

4.28 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยโดยใช้กากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 67

4.29 ผลของชนิดแหล่งไนโตเจนต่อการผลิตตัวทำละลาย โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 68

4.30 ผลของชนิดแหล่งไนโตเจนต่อการผลิตกรด โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 68

4.31 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 69

4.32 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 74

4.33 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 75

4.34 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 76

4.35 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 77

4.36 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย น้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรส ยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน.ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 78

4.37 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร 79

4.38 ผลของแหล่งอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) ไนโตรเจนต่อการผลิตตัวทำละลาย.*C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 80

4.39 ผลของแหล่งอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) ไนโตรเจนต่อการผลิตกรด โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 80

รูปที่ หน้า

4.40 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 81
ค.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 108

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

μ = มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)

Q_{ac} = อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)

ν_{ac} = อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)

Q_{sol} = อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)

ν_{sol} = อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมูลค่าน้ำมันดิบภายในประเทศไทยมีราคาสูงขึ้นเนื่องจาก ปริมาณน้ำมันดิบที่นำเข้าในปี พ.ศ. 2554 อยู่ที่ระดับ 791 ล้านบาร์เรลต่อวัน โดยราคาของน้ำมันดิบเพิ่มร้อยละ 35.6 หรือ เพิ่มขึ้น 30.62 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล สังเกตได้จาก ตารางที่ 1.1 ราคาการนำเข้าน้ำมันดิบเฉลี่ยในปี พ.ศ. 2553 เท่ากับ 79.48 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล เมื่อเทียบกับราคาน้ำมันดิบในปี พ.ศ. 2554 อยู่ที่ระดับ 110.10 เหรียญสหรัฐต่อบาร์เรล (สำนักงานนโยบาย และพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2555) จากราคาน้ำมันดิบที่มีค่าเพิ่มขึ้นผนวกกับแหล่งพลังงานสำรองในประเทศที่ค่อยๆ ลดลง อาจส่งผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมในประเทศได้ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเสาะหาพลังงานทดแทน รูปแบบอื่นมาทดแทนการใช้นำมันเชื้อเพลิงจากฟอสซิล

ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณ และราคานำเข้าน้ำมันดิบในปี พ.ศ. 2550-2554*

	2550	2551	2552	2553	2554	ร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลง		
						2552	2553	2554**
ปริมาณ (พันบาร์เรล/วัน)	804	812	803	816	791	-1.0	1.6	-3.1
ราคาเฉลี่ย ($ US/บาร์เรล)	70.54	101.44	61.90	79.48	110.10	-39.0	28.4	35.6
มูลค่า (พันล้านบาท)	716	1,003	623	754	981	-37.9	21.0	30.1

*สำนักงาน และนโยบาย กระทรวงพลังงาน, 2555

**เบื้องต้น

ชีวมวลเป็นพลังงานรูปแบบหนึ่งที่น่าสนในสำหรับประเทศที่เป็นประเทศเกษตรกรรมอย่างประเทศไทยที่มีวัตถุดิบ และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เนื่องจากมีการปลูกพืชทดแทนอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถนำมาผลิตเป็นเชื้อเพลิง เช่น บิวทานอล เอทานอล และอะซิโตน เป็นต้น โดยมีการนำเอทานอลมาใช้เป็น สารเติมแต่งปรับปรุงค่ากลุ่มออกซิเจน (Oxygenates) และออกเทน

(Octane) สำหรับบิวทานอล (สำนักงานนโยบาย และพลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2555) เป็นเชื้อเพลิงอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติดีกว่าเอทานอล

ตารางที่ 1.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของบิวทานอลกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น (Sangและคณะ, 2008)

	คุณสมบัติของเชื้อเพลิง			
	บิวทานอล	**น้ำมันเบนซิน**	**เอทานอล**	**เมทานอล**
ความหนาแน่นของพลังงาน (เมกะจูลต่อลิตร)	29.2	32	19.6	16
อัตราส่วนผสมระหว่างอากาศและเชื้อเพลิง	11.2	14.6	9	6.5
ความร้อนแฝงของการกลายเป็นไอ (เมกะจูลต่อลิตร)	0.43	0.36	0.92	1.2
ค่าออกเทนโดยวิธีวิจัย (RON)	96	91-99	129	136
ค่าออกเทนโดยวิธีมอเตอร์ (MON)	78	81-89	102	104

บิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาผสมกับน้ำมันเบนซิน และนำมันดีเซลล์เช่นกันโดยมีข้อดีเปรียบเทียบหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอล คือ จากตารางที่ 1.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของบิวทานอล พบว่าสามารถ ให้พลังงานในการเผาไหม ถึง 29.2 เมกะจูลต่อลิตร โดยมีความใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซินมากกว่าเอทานอล ทั้งนี้เพราะบิวทานอลมีพันธะของคาร์บอนสี่อะตอมต่อกัน แต่เอทานอลมีเพียงคาร์บอนสองอะตอมเท่านั้น (Sang และคณะ, 2008) จึงทำให้มี ค่าออกเทน (octane number) สูงกว่าเอทานอลใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลได้ดีมีประสิทธิภาพสูงกว่า เมื่อใช้บิวทานอลร่วมกับนำมันเบนซิน และดีเซลในอัตราส่วนร้อย 10-50 นอกจากยังช่วยลดการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สู่บรรยากาศ และมีการดูดซึมน้ำที่ต่ำกว่า รวมทั้งมีสมบัติในการผสมกับน้ำมันเบนซินดีกว่า และใช้กับเครื่องยนต์สันดาปธรรมดาแบบไม่ต้องดัดแปลง (Dürre , 2007) จึงช่วยเพิ่มสมรรถนะของเครื่องยนต์ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีสมบัติการละลายได้อย่างสมบูรณ์ในน้ำมันเบนซิน และดีเซลจึงไม่เกิดปัญหาการแยกชั้นอย่างเอทานอล นอกจากนี้การกัดกร่อนภายในห้องเผาไหมเครื่องยนต์เกิดได้น้อยกว่าเอทานอลมาก

บิวทานอลเป็นเชื้อเพลิงที่สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์โดยไม่ใช่ออกซิเจน กลุ่มครอสตริเดียมทำให้เกิดแอลกอฮอล์ 3 ชนิด คือ บิวทานอล เอทานอล และอะซิโตน โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตร และเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

(Renewable energy) เช่น มันสำปะหลังสด, ผักตบชวา (จิรกานต์และคณะ, 2554) และน้ำอ้อย (อังคณา, 2553) เป็นต้น

น้ำซึ่งได้มาจากการหีบอ้อยของโรงงานผลิตน้ำตาล นับว่าเป็นวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมสำหรับการใช้ในการหมักบิวทานอล เนื่องจากอ้อยมีราคาถูก สามารถหาได้ง่านตลอดเวลาทั้งปี และมักจะประสบปัญหาราคาขายที่ตกต่ำ เมื่อนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโต และผลิตผลิตภัณฑ์ จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ปริมาณแร่ธาตุ และวิตามินที่อยู่ในองค์ประกอบของน้ำอ้อยมีส่วนส่งเสริมกระบวนการหมักของคลอตริเดียมได้เป็นอย่างดี แหล่งไนโตรเจน (อินทรีย์ และอนินทรีย์ สำหรับการเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์โดยตรง โดยการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ ช่วยในการเพิ่มปริมาณ และสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ (อังคณา, 2553; นันทนัช, 2554) โดยสารสกัดยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณบิวทานอลที่ได้ดังนั้น แต่เนื่องจากมีราคาสูง จึงจำเป็นต้องหาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆมาทดแทน

ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์ในการผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้น้ำอ้อยเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ของเชื้อคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์และศึกษาใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาทดแทนการใช้สารสกัดยีสต์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์คลอสตริเดียม และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (สารสกัดยีสต์, แอลไลซีน และกากผงชูรส) และไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีต่อกระบวนการหมักบิวทานอลในระบบแบบกะ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาชนิดสายพันธุ์เชื้อคลอสตริเดียม และความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกะ

1.3.1.1 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

1.3.1.1.1 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร

1.3.1.1.2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร

1.3.1.2 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259

1.3.1.2.1 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร

1.3.1.2.2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร

1.3.1.3 *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BAA 117

1.3.1.3.1 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร

1.3.1.3.2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร

1.3.2 ศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล จากเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ

1.3.2.1 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดเดียว

1.3.2.1.1 สารสกัดยีสต์

1.3.2.1.2 แอลไลซีน

1.3.2.1.3 กากผงชูรส

1.3.2.2 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์

1.3.2.2.1 สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต

1.3.2.2.2 แอลไลซีนร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต

1.3.2.2.3 กากผงชูรสร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต

1.3.3 วิเคราะห์ผลการทดลอง ด้วยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมัก 1 ลิตร และหาค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

1.3.3.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ)

1.3.3.2 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ν)

1.3.3.3 อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (productivity, **Q**)

1.3.3.4 ผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์ (Yield)

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้ข้อมูลความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อกระบวนการหมักบิวทานอลโดยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์คลอสตริเดียม (*Clostridium*) และแหล่งไนโตรเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมัก 1 ลิตร เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติการหมัก อะซิโตน–บิวทานอล–เอทานอล

การผลิตบิวทานอลจากจุลินทรีย์ มีรายงานว่าเกิดขึ้นครั้งแรก โดย Pasteur ปี ค.ศ. 1861 ในช่วงหลังศตวรรษที่ 19 การผลิตบิวทานอลจากจุลินทรีย์จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัย ผู้ที่ค้นพบว่า มีอะซิโตนเกิดขึ้นร่วมกับบิวทานอลจากการหมัก คือ Sehardinger ปี ค.ศ. 1906 ต่อมาภายหลัง มีการแยกจุลินทรีย์ *Clostridium acetobutylicum* จากการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล ได้สำเร็จ โดย Dr.Weizman ปี ค.ศ. 1906 นับเป็นก้าวแรกสำหรับอุตสาหกรรม การหมัก อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล (David และคณะ, 1986) สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 มีการยกระดับการผลิต อะซิโตนสู่อุตสาหกรรมการทำระเบิด ส่วนบิวทานอลผ่านสังเคราะห์เป็นบิวตะไดอีนเพื่อใช้ผลิตเป็นยางสังเคราะห์ เมื่อสงครามยุติลง ความต้องการ อะซิโตนก็น้อยลงจึงทำให้โรงงานผลิตอะซิโตนหยุดชะงักลง

ปี ค.ศ.1930 ได้มีการคัดแยกสายพันธุ์ *Clostridium Saccharoacetobutylicum* จากการหมักโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้สำเร็จ หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 การผลิตบิวทานอลด้วยวิธีการทางชีวภาพถูกแข่งขันด้วยอุตสาหกรรมโตรเคมี เมื่อปี ค.ศ. 1973-1979 เป็นต้นมาเนื่องจากมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า (สุรทร กาญจนทวี, 2537) ผนวกกับราคาผลผลิตทางการเกษตรที่ใช้เป็นสารตั้งต้นมีราคาที่เพิ่มขึ้น แต่ปัจจุบันปริมาณน้ำมันดิบที่ลดตัวลงแล้วราคาก็เพิ่มสูงขึ้นจึงทำให้อุตสาหกรรมการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จากกระบวนการหมักจึงได้รับความสนใจขึ้นอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำมาเป็นแหล่งพลังงานทดแทนในอนาคต

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จุลินทรีย์กลุ่มคลอสตริเดียม (Clostridia) เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกระบอก มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ เจริญได้ดีในสภาวะไรออกซิเจนอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม 4.5-6.8 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้จากน้ำตาลหลายชนิด เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลชนิดอื่นๆ (เพนโทส, เฮกโซส) (David และคณะ, 1986) แหล่งไนโตรเจน เช่น สารสกัดยีสต์ โดยทั่วไปช่วยทำให้เซลล์เจริญเติบโตที่ดี และยังเพิ่มปริมาณตัวทำละลาย (Monot และคณะ, 1982) จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้ไนโตรเจนได้โดยตรงผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจนในรูปของ

แอมโมเนียมอิออน และกรดอะมิโนต่างๆ โดยสารสกัดยีสต์หรือหางนมเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความซับซ้อนซึ่งสารมารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Qureshi และคณะ2006) อุตสาหกรรมการผลิตตัวทำลายจุลินทรีย์กลุ่มคลอสตริเดียมที่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ ดังกล่าวได้แก่

2.2.1 *Clostridium acetobutylicum* เป็นชนิดที่นิยมในอุตสาหกรรม การผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล โดยมีอัตราส่วนประมาณ 6:3:1 ตามลำดับ เช่น *C. acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 (นันทนัช, 2554)

2.2.2 *Clostridium beijerinckii (C. butylicum)* ผลิตตัวทำละลายในอัตราส่วนเดียวกับ *Clostridium acetobutylicum* คือ 6:3:1 แต่ แทนที่จะผลิต อะซิโตน จะผลิตไอโซโพรพานอลแทน ส่วนตัวทำละลายชนิดอื่นยังคงเหมือนเดิม เช่น *Clostridium beijerinkii* BA 101, *Clostridium acetobutylicum* P260 (Nasib และคณะ, 2008) และ*Clostridium beijerinkii* NRRL B592 (ชุติมณฑน์ และคณะ 2552)

2.2.3 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ผลิตตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เช่น *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (Monot และคณะ, 1982)

2.2.4 *Clostridium saccharobutylicum* ผลิตตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ไอโซโพรพานอล โดยใช้สารตั้งต้นที่ต่างกัน

2.2.5 *Clostridium aurantibutyricum* ผลิตทั้งอะซิโตน และisopropanol นอกเหนือไปจากบิวทานอล (George และคณะ, 1983)

2.2.5 *Clostridium tetanomorphum* ผลิตบิวทานอล และเอทานอลเกือบเท่ากัน แต่ไม่มีตัวทำละลายชนิดอื่น (Gottwald และคณะ 1984)

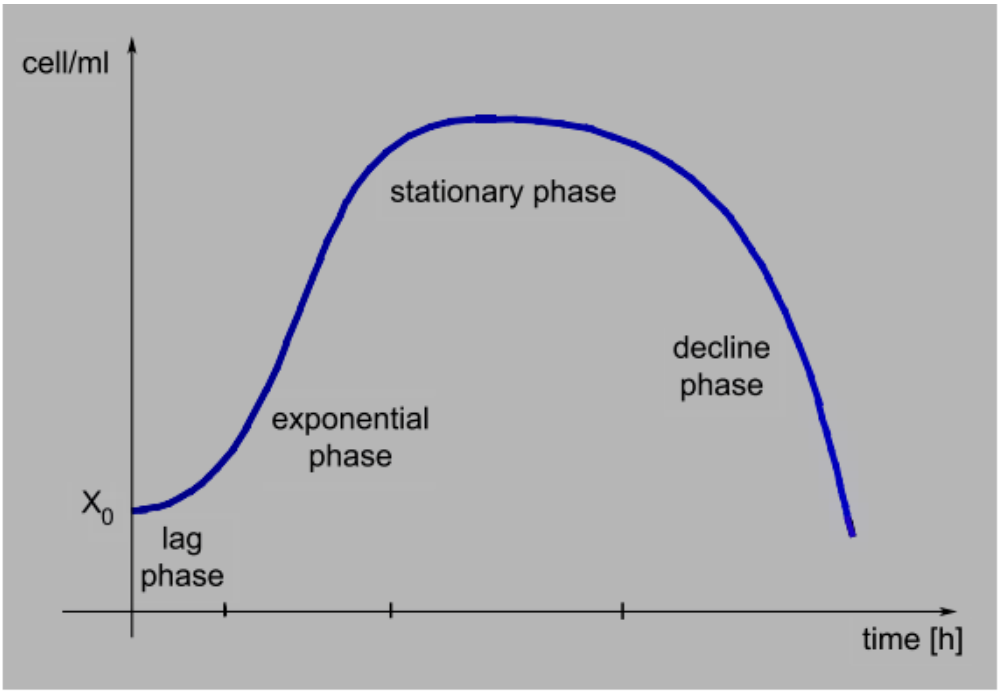
โดยในการทดลองนี้ให้ความสนใจเชื้อสามสายพันธุ์เช่น *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 และ*Clostridium saccharobutylicum* หาข้อมูลมาอธิบายชื้อทั้งสามสายพันธุ์(หาข้อมูลมาอธิบายว่าทำไมถึงเลือกเชื้อทั้งสามสายพันธุ์

2.3 กระบวนการผลิตทางชีวเคมีของกระบวนการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล

กระบวนการผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล เกิดจากกระบวนการหมัก 2 ช่วง คือ กระบวนการสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenesis) และกระบวนการสร้างตัวทำละลาย (Soventogenesis) (Mitchell, 1998)

2.3.1 กระบวนการการสร้างกรดอินทรีย์

เริ่มจาก น้ำตาลกลูโคสถูกเมตาโบไลต์ (Metabolite) ด้วยกระบวนการเอ็มเดน–เมเยอร์ฮอฟ–พานาส (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) เป็นไพรูเวต (Pyruvate) แล้วเปลี่ยนเป็นอะซิทติลโคเอ (Acety Co-A) ต่อจากนั้นเปลี่ยนเป็น กรดอะซิติก (Acetic acid) ส่วนบิวไทริลโคเอ (Butyryl Co-A) เปลี่ยนเป็นกรดบิวทิวริก (Butylric acid) ในช่วงนี้ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายในกระบวนการหมักนั้นลดลง โดยเป็นช่วงระยะพักตัว (lag phase) และระยะเพิ่มจำนวน (exponential growth phase) ช่วงนี้มีอะซิโตน และแลคเตต เกิดขึ้นในปริมาณไม่มากนัก รวมทั้งเกิดอะซิเตต บิวทีเรต คาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญในการผลิตตัวทำละลาย เมื่อกรดเพิ่มมากขึ้นจะไปยับยังการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้เซลล์ตายลง ดังระยะลดลงของเซลล์ (Decline phase) ดังรูปที่ 2.1

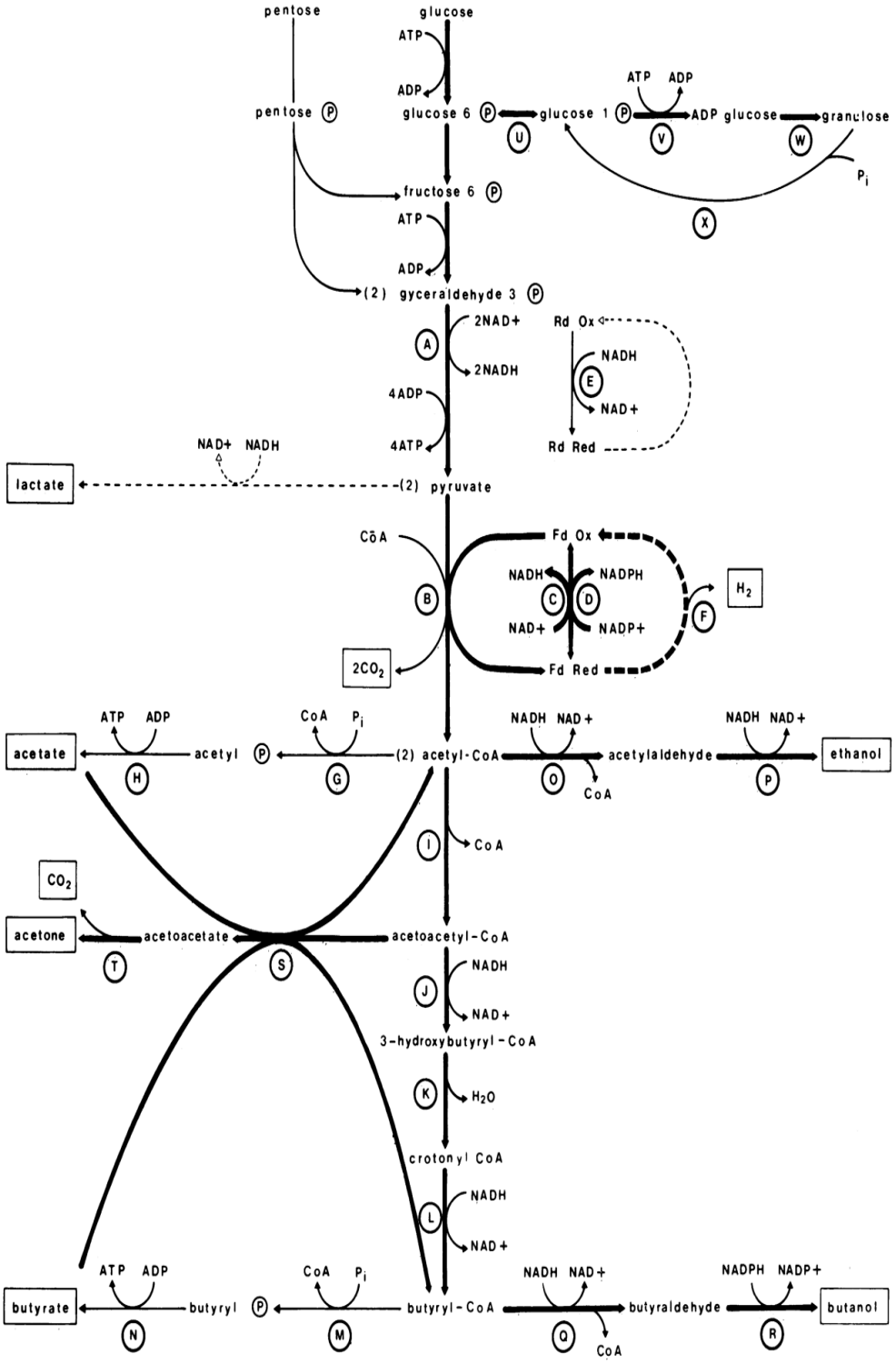


รูปที่ 2.1 ภาพแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์แบบกะ (bath)

(Carcano และคณะ, 2010)

2.3.2 กระบวนการการสร้างตัวทำละลาย

เริ่มต้นเมื่อค่าความเป็นกรดด่างลดลงประมาณ 4.8 ใน 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่ความเข้มข้นของกรดทั้งสองชนิดมีการสะสมมากขึ้นจะกระตุ้นให้เชื้อคลอสตริเดียมใช้กรดอินทรีย์ และแหล่งคาร์บอนไปด้วยกัน เพื่อเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล โดย กรดอะซิติกถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตน ส่วนบิวไทริลโคเอถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และอะซิทิลโคเอเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (Acetyldehyde) แล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอลในที่สุด โดยจุดที่กรดอินทรีย์เปลี่ยนเป็นตัวทำละลายเรียกว่า “pH break point” จะเกิดขึ้นเมื่อปริมาณกรดอินทรีย์ค่อยๆ ลดลง ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายในกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น แล้วทำให้ปริมาณการสร้างก๊าซไฮโดรเจนจะลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของระยะการสร้างกรด (Tashiro, 2004) ดังรูปที่ 2.2 การสร้างสปอร์มีความสัมพันธ์กับระยะการสร้างตัวทำละลายอินทรีย์ของจุลินทรีย์ ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 5.5



รูปที่ 2.2 แสดงกระบวนการการสร้าง อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล (David และคณะ, 1986)

2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

กระบวนการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เปลี่ยนเป็น ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ประมาณร้อยละ 32-34 เท่านั้น ปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นมากกว่ากว่าตัวทำละลาย 1.5 เท่า โดยสารมารถเกิดเป็นก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนได้ถึงร้อยละ 70 ในอัตราส่วน 3:2 ส่วนตัวทำละลายเกิดขึ้นประมาณร้อยละ 30 ในอัตราส่วนของ บิวทานอลต่ออะซิโตนต่อเอทานอลเท่ากับ 6:3:1 ที่เหลือเกิดเป็นกรดอินทรีย์ (กรดอะซิติก และกรดบิวทิริก) ในปริมาณน้อยมาก ดังเช่น กระบวนการหมักจุลินทรีย์สายพันธุ์ *C.acetobutylicum* มีการผลิตผลิตภัณฑ์ ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก จุลินทรีย์สายพันธุ์ C.acetobutylicum (David, และคณะ, 1986)

ชนิดผลิตภัณฑ์	โมล/โมล ของกลูโคสที่ใช้ในการหมัก		
	การหมักทั้งหมด	ขั้นตอนการผลิตกรด	ขั้นตอนการผลิตตัวทำละลาย
H_2	1.35	2.5	1.4
CO_2	2.21	2.0	2.3
Acetate	0.14	0.5	-
Butyrate	0.04	0.75	-
Acetone	0.22	-	0.3
Butanol	0.56	-	0.65
Ethanol	0.07	-	0.1
ATP/ กลูโคส		3.25	2.0
Solvent yield (ร้อยละ)	32	-	36.7

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

2.5.1 แหล่งคาร์บอนในการหมัก

แหล่งคาร์บอนถือเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงาน และเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ของการสร้างเซลล์ และร้อยละ 50-55 สำหรับจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศ (สมใจ ศิริโภค, 2555) ตัวอย่างกลุ่มน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลเฮกโซส และเพนโทส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่กลุ่มเชื้อคลอสตริเดียมสามารถเจริญเติบโตได้ วัตถุดิบที่สามารถผลิตตัวเป็นทำละลายบิวทานอลได้ เช่น กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง ผักตบชวา น้ำอ้อย เป็นต้น ในวัตถุดิบที่เป็นพวกลิโนเซลลูโลสต้องผ่านการปรับสภาพก่อน เช่น การใช้กรดเจือจาง (Purwadi และคณะ, 2004)การใช้น้ำร้อนที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ (Mosier และคณะ, 2005) และการใช้วิธีการย่อยเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber expansion) (Teymouri และคณะ, 2005) หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยกรดหรือเอนไซน์เพื่อย่อยสลายให้ได้น้ำตาล นอกจากการใช้น้ำตาลแล้วยังมีการใช้กลีซอรอล (จิรวรรณ และคณะ, 2555) และสลัดด์จากโรงงานน้ำมันปาล์มอีกด้วย (Cirilo และคณะ, 2008) แต่โดยทั่วไปสำหรับการผลิตบิวทานอลนั้นนิยมการใช้น้ำตาลในการผลิต

2.5.2 แหล่งไนโตรเจนในการหมัก

จุลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการไนโตรเจนของแตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งอาหารที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่บางชนิดต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์

2.5.2.1 แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

แอมโมเนีย อาจใช้ในรูปแก๊ส หรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 25 การใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องระมัดระวังในเรื่องการเก็บรักษา เนื่องจากแอมโมเนีย ระเหยง่ายจึงต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ป้องกันการระเหย และทนต่อการกัดกร่อนได้

เกลือแอมโมเนียม ชนิดที่มีราคาสูงสุดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ตามปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะเกิด SO_4^{-2} ขึ้นในทางตรงข้ามแก๊สแอมโมเนีย และไนเตรทเมื่อถูกเมแทบอไลซ์ ปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ในกรณีที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรท ตามปกติในระยะแรก NH_4^+ จะถูกใช้ไปก่อน ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด จนกระทั่ง NH_4^+ หมด จุลินทรีย์จึงสังเคราะห์เอนไซม์ nitrate reductase และใช้ไนเตรท

เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น ยกเว้นใน *Gibberella fujikuroiI* ที่ไนเตรทจะยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลาย NH_4^+ ทีค่าความเป็นกรดด่าง

แอมโมเนียมอะซิเตต มีบทบาทต่อการเจริญเติบโต และการผลิตตัวทำละลาย ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1.1-2.2 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตกรดมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง (Monot, F. และคณะ, 1982) ดังนั้นไนเตรทจึงถูกใช้ไปก่อน จนกระทั่งค่าความเป็นกรดด่างสูงมากพอ จึงจะมีการเมทาบอไลซ์ NH_4^+ ได้ (สมใจ ศิริโภค, 2555)

Joseph W. ROOS และคณะ (1984) ศึกษาการใช้แอมโมเนียมซัลเฟสเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยเชื้อ C. *acetobutylicum* ATCC 824 พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟส ที่มีความเข้มข้นต่ำสามารให้ปริมาณตัวทำละลายได้สูง ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.7

M.S. Madihah และคณะ (2001) ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนออินทรีย์ ร่วมกับยีสต์สกัดในปริมาณคงที่โดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (แอมโมเนียมไนเตต, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมฟอสเฟต) ในปริมาณที่เท่ากันโดยใช้เชื้อ C. acetobutylicum P262 พบว่า การใช้แอมโมเนียมไนเตต ให้ปริมาณตัวทำละลายรวมสูงสุดเท่ากับ 18.78 กรัมต่อลิตร และปริมาณของบิวทานอล 15.24 กรัมต่อลิตร

Yang Gu และคณะ (2009) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) โดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 โดยใช้ corn medium เป็นแหล่งคาร์บอน ผลปรากฏว่า แอมโมเนียมอะซิเตตมีฤทธิ์ส่งเสริมการผลิตตัวทำละลายได้เป็นอย่างดี

2.5.2.2 แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน นิยมใช้ในรูปแบบ กรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยปกติไนโตรเจนอินทรีย์เป็นอาหารที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์แล้วในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะสามารถเจริญได้ดีในกรดอะมิโนเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพงจึงใช้กรดอะมิโนที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนแทน

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ฟาร์มามีเดีย และสารสกัดยีสต์ (yeast extract) เป็นต้น (สมใจ ศิริโภค, 2555) งานวิจัยที่เกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจน

Welsh และคณะ (1986) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรียร่วมอนินทรีย์ โดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในการผลิต อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล พบว่า มีการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลิตตัวทำละลายรวมได้สูง

Khare และคณะ (1995) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ การใช้กากถั่วเหลืองมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Aspergillus niger ในการหมัก และมีการสร้างกรดซิตริก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5-10 ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

Witjira และคณะ (1996) ศึกษาการใช้น้ำนมข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนด้วยการหมักน้ำนมข้าวโพดโดยจุลินทรีย์ *C. thermoaceticum* ATCC 49707 สำหรับการผลิตอะซิเตต ผลปรากฏว่า ได้ปริมาณอะซิเตตน้อยกว่าการใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

Lay และคณะ (2001) ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เช่น สารสกัดยีสต์ ทริปโทน และเปปโทน ผลปรากฏว่า การใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนมากที่สุด สำหรับการหมักโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357

Mohd และคณะ (2008) ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น สารสกัดยีสต์ ทริปโทน และ เปปโทน ใช้ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า สารสกัดยีสต์สามารถให้การผลิตไฮโดรเจนที่มีปริมาณมากที่สุด โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* NCIMB 13357 และทำให้เซลล์สารมารถเจริญเติบโตได้ดี แต่เซลล์จะเจริญเติบโตได้ช้าลงเมื่อใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแทนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน
คือ ใช้แอมโมเนียมอะซิเตต

อังคณา และคณะ (2553) ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ คือ สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต พบว่า สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว

จากงานงานวิจัยที่หลายๆ งานผ่านมาแล้ว เกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ช่วยเน้นยำว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นั้นมีความสำคัญเพียงใด งานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจแหล่งไนโตรเจนชนิดดังต่อไปนี้

ยีสต์สกัด (Yeast extract) เป็นสารประกอบที่ได้จากการออโต้ไลซิสยีสต์ (S*accharomyces cerevisiae)* โดย ผลิตภัณฑ์ที่ได้อุดมไปด้วยแร่ธาตุ วิตามิน กรดอะมิโนที่สำคัญ และโกรทแฟคเตอร์ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Parekh และ Blaschek, 1999) ดังตารางที่ 2.2

งานวิจัยของ Tadahiro และคณะ (1995) ศึกษากรดอะมิโนจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Clostridium difficile* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่า Cysteine,isoleucine, leucine, proline, tryptophan และ valine ส่วน Arginine, glycine, histidine, methionine และthreonine ช่วยเสริมการเพิ่มปริมาณของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินจำเป็น Biotin, pantothenate และpyridoxine

แอลไลซีน (L-lysine monohydrochloride) เป็นกรดอะมิโนที่แยกจากของที่เหลือจากกระบวนการผลิตผงชูรส (จากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด) ส่วนใหญ่ใช่ในอุตสาหกรรม อาหารสัตว์ เพราะแอลไลซีนเป็นอะมิโนที่จำเป็นสำหรับมนุษย์

การผงชูรส (Ajinomoto waste) จากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด มีองค์ประกอบขอกกรดอะมิโนหลายชนิด เพราะว่า เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหลือจากกระบวนการหมักผงชู-รส และผ่านการทำให้เซลล์แตก ดังนั้นจึงมี เอนไซม์ และกรดอะมิโน อยู่หลายชนิด ดังตารางที่ 2.

ตารางที่ 2.2 แสดงกรดอะมิโนที่พบในยีสต์สกัด (Organotechnie, 2008)

Amino Acids		**Total – T (g/100g)**
Alanine	Ala	4.1
Arginine	Arg	2.8
Aspartic acid	Asp	6.0
Cystine	Cys	0.6
Glutamic acid	Glu	11.0
Glycine	Gly	2.5
Histidine	His	1.1
Isoleucine	Iso	2.6
Leucine	Leu	3.7
Lysine	Lys	4.2
Methionine	Met	0.8
Phenylalanine	Phe	2.5
Proline	Pro	2.2
Serine	Ser	2.7
Threonine	Thr	2.6
Tryptophan	Tryp	0.8
Tyrosine	Tyr	0.8
Valine	Val	3.1

ตารางที่ 2.3 แสดงกรดอะมิโนที่พบนากากผงชูรส

(บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด, 2546)

Amino Acids		**Total – T (g/100g)**
Alanine	Ala	1.00
Arginine	Arg	0.03
Aspartic acid	Asp	0.23
Glutamic acid	Glu	4.45
Glycine	Gly	0.07
Histidine	His	0.04
Isoleucine	Iso	0.09
Leucine	Leu	0.05
Lysine	Lys	0.12
Serine	Ser	0.06
Threonine	Thr	0.02
Valine	Val	0.08

2.5.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยปกติมีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ และแคลเซียม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้แก่ โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โม-ลิบดินัม และสังกะสี แต่ส่วนใหญ่มักจะพบว่าแร่ธาตุเหล่านี้มีการเจือบนอยู่ในน้ำ ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งส่วนใหญ่มีเพียงพออยู่แล้ว เช่น น้ำแช่ข้าวโพด และฟาร์มาเดียร์ ดังนั้นในบางครั้งอาจจะไม่มีการเติมแร่ธาตุลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกเว้นการเตรียมอาหารที่มีการสังเคราะห์ จึงมีความจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ไปโดยตรง แร่ธาตุที่นิยมส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ (สมใจ ศิริโภค, 2555) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.4 แสดงความเข้มข้นของแร่ธาตุที่นิยมเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

(สมใจ ศิริโภค, 2555; Stanbury และคณะ, 1984)

สารประกอบ	ช่วง (g/L)
KH_2PO4^*	1.0-4.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.25-3.0
KCl	0.5-12.0
$CaCO_3$	5.0-17.0
$FeSO_4.4H_2O$	0.01-0.1
$ZnSO_4.8H_2O$	0.1-1.0
$MnSO_4.H_2O$	0.01-0.1
$CuSO_4.5H_2O$	0.003-0.01
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01-0.1

*อาหารที่ได้จากซากพืชซากสัตว์ตามปรกติจะมีอนินทรีย์ฟอสเฟสข้อนข้างสูงอยู่แล้ว

ตัวอย่างแร่ธาตุที่มีความสำคัญได้แก่

แมงกานีส (Mn) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้ามากกว่านี้ จะมีอิทธิพลต่อการผลิตบิวทานอล โดยอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายลดลง (Monot และคณะ, 1982)

แมกนีเซียม (Mg) ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.05-0.2 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิตตัวทำละลาย และการใช้น้ำตาลของคลอสตริเดียมดีที่สุด (Monot และคณะ, 1982)

เหล็ก (Fe) ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณเหล็กที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่เติมเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การเจริญเติบโตช้าลง น้ำถูกใช้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายเพียง 25 เปอร์เซ็นต์

โปแตสเซียม (K) ผลต่อการใช้กลูโคสของเชื้อคลอสตริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตกรดมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง (Monot และคณะ, 1982)

2.5.4 วิตามิน

วิตามินเป็นสารจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถวิเคราะห์จุลินทรีย์ได้เองตามธรรมชาติ แต่ก็มิจุลินทรีย์บางชนิดที่ยังไม่สามารถสังเคราะห์จุลินทรีย์ได้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแหล่งวิตามินส่วนใหญ่มีในแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนอยู่แล้ว แต่บางครั้งทั้งสองแหล่งนี้อาจะมีวิตามินไม่ครบถ้วนจึงต้องมีการเติมวิตามินเพิ่มเพื่อให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่ดี (สมใจ ศิริโภค, 2555)

การเติมวิตามินให้กับจุลินทรีย์กลุ่มครอสตริเดียมยังมีงานวิจัยที่ยังไม่แน่ชัดสำหรับการผลิตตัวทำละลาย วิตามินที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีอยู่ในสารสกัดยีสต์(yeast extract) เช่นไบโอติน (Biotin) และพาราอะมิโนเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) โดยปริมาณที่เหมาะสม คือ 0.01 กรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Monot และคณะ, 1982)

สารสกัดยีสต์ มีกรดอะมิโนที่สำคัญ และโกรทแฟคเตอร์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และพบว่ามีที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ หรือปริมาณไนโตรเจนจำกัดสำหรับการหมัก (nitrogen-limited) จะมีการผลิตตัวทำละลายมากขึ้น (Parekh และ Blaschek, 1999) โดยในกระบวนการหมักแบบกะ และการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่า การผลิตบิวทานอลจะลดลงเมื่ออัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่า 7.3

หางนมเข้มข้น (whey protein concentration) มีส่วนประกอบของโปรตีนสูงถึงร้อยละ 70 แต่ไม่มีส่วนประกอบของน้ำตาลแลคโตส จึงสามารถใช้ทดแทนสารสกัดยีสต์ และทริปโทนได้ แต่จะทำให้กระบวนการสร้างตัวทำละลายนั้นเกิดได้ช้าลง เนื่องจากต้องมีการปรับสภาพเซลล์นานขึ้นในช่วง (lag phase) แต่สามารถผลิตบิวทานอลได้ดีกว่า (Qureshi และคณะ, 2006)

ส่วนผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้จากอุตสาหกรรมแป้งข้าวโพด คือ น้ำแป้งข้าวโพด (corn steep water , CSW) จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตบิวทานอล เพราะว่า อุดมไปด้วย กรดอะมิโน วิตามิน ไนโตรเจน และเกลือแร่ จึงสามารถใช้แทนอาหารเสริมได้ดี โดยพบว่าเมื่อใช้น้ำต้มข้าวโพดร่วมกับกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โดย เชื้อ *C. beijerinckii* BA101 จะให้ผลิตภัณฑ์เป็น บิวทานอล 16 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักที่มีขนาดของถังหมัก 20 ลิตร และใช้น้ำต้มข้าวโพดร่วมกับกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เมื่อขยายขนาดถังหมักเป็น 200 ลิตร จะได้ปริมาณบิวทานอล เท่ากับ 17.8 กรัมต่อลิตร เนื่องจาก กรดแลคติค ซัลไฟต์ กรดฟีลิค โลหะหนัก และเกลือของโลหะในน้ำต้มข้าวโพดเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นต้องมีการเจือจางน้ำต้มข้าวโพดก่อนที่จะนำมาใช้ (Parekh และ Blaschek, 1999)

2.5.5 ความเข้มข้นของน้ำตาล

กระบวนการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล นั้นปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ดังเช่น เชื้อคลอสตริเดียมที่ใช้ในอุตสาหกรรม *C. acetobtylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* NCIMB 8825, *C. beijerinckii* NRRL B592, *C. saccharobutylicum* NCP P262 และ *C. beijerinckii* BA101 ในกระบวนการหมักแบบกะจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลให้เหมาะสม เพราะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณบิวทานอลที่เกิดขึ้น จากงานวิจัยที่ใช้ สารสกัดยีสต์, ทริปโทน, และแอมโมเนียมอะซิเตต เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *C. acetobtylicum* ATCC 824 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 45, 60, 80 และ90 จะให้ปริมาณของบิวทานอลเป็น 3.16, 3.81, 15.35 และ12.75 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (อังคณา สุจริต, 2553)

2.5.6 การสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อ

การสเตอริไลส์ มีผลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน เพราะว่า การให้ความร้อนภายใต้ความดันสูง ถ้าผู้ทำการทดลองใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนควรต้องแยกน้ำตาลออกจากองค์ประกอบอื่น เพราะว่าที่ความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง น้ำตาลจะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนได้เป็นสารประกอบไนโตรเจน ทำให้อาหารมีสีน้ำตาลเข้ม และอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้บางส่วน (สมใจ ศิริโภค, 2555)

2.5.7 การ ทำ heat Shock

การทำ heat shock ยังไม่มีการรายงานอย่างแน่ชัดมากนัก ต่อผลการผลิตผลิตบิวทานอล แต่การทำ heat shock ตามงานวิจัย พบว่า มีผลต่อการกระตุ่นโปรตีนในจุลินทรีย์ และมีเพิ่มความสามารถในการเพิ่มผลิตภัณฑ์ และทำให้จุลินทรีย์ทนทานต่อการปริมาณบิวทานอลที่เกิดขึ้น และทำให้จุลินทรีย์ในรุ่นต่อๆมามีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างว่องไว เช่น การหมักโดย *C. beijerinckii* NRRL B592 การทำ heat shock ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำให้มีผลต่อการผลิตตัวทำละลายได้ดีต่างกัน จากงานวิจัยนี้อุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณตัวทำละลายมากที่สุด (Stanbury และWhitaker, 1984) เนื่องจากไปเร่งการเจริญของสปอร์ แต่โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิในการทำ heat shock ที่เหมาะจะอยู่ในช่วง 70-80 องศาเซลเซียส แต่อื่นไดนั้นก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์

2.5.8 อุณหภูมิของการหมัก

อุณหภูมิมีความสำคัญในการผลิตตัวทำละลาย และนอกจากนี้อุณหภูมิในช่วง 29-35 ยังมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากงานวิจัย พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระบวนการหมัก อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส โดยใช้มันสำปะหลังสด และน้ำตาลที่ได้จาการ

ย่อยสลายผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตบิวทานอล ด้วยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 (ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล, 2553)

2.5.9 อิทธิพลของการกวน

การกวนในถังหมักมีผลต่ออัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ จากงานวิจัยที่ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบเพิ่มขึ้น จนถึง 340 รอบต่อนาที จะทำให้อัตราการผลิตอะซิโตน, บิวทานอล และเอทานอล 5.54, 3.85 และ 0.8 มิลลิโมลต่อชั่วโมง สูงสุดตามลำดับตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบเป็น 360 รอบต่อนาที อัตราการผลิตตัวทำละลายจะมีค่าเป็น 0 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ถ้ามีความเร็วรอบมากเกินไปอาจทำให้ของเซลล์เสื่อมสภาพได้ (Stanbury และ Whitaker, 1984)

2.5.10 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดด่างมีความจำเป็นในการเจริญเติบโต และผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับจุลินทรีย์ จะอยู่ในช่วงประมาณ 3.8-5.5 ค่าความเป็นกรดต่างเป็นตัวกำหนดการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จึงต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ค่าสูงจะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรด ในขณะที่การควบคุมที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ จะมีผลให้เกิดตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยมีงานวิจัยที่ศึกษา ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล เท่ากับ 4.5, 5, 5.5 และไม่ควบคุมโดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณบิวทานอลเท่ากับ 0.89, 0.35, 1.69 และ 1.11 ตามลำดับ (อังคณา และคณะ, 2553)

2.5.11 การยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์

ในกระบวนการผลิตบิวทานอล ปริมาณบิวทานอลที่เกิดขึ้นมีผลต่อเซลล์โดยตรง เนื่องจากความเป็นพิษนี้อาจจะไปทำละลายไลโปโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้มีผลต่อความเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ โดย *C. acetobutylicum* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นบิวทานอลเป็นส่วนใหญ่มีผลต่อการเจริญเตอบโตของเซลล์ (Tarkow และ Feist, 1969) อีกงานวิจัยหนึ่งรายงานว่าบิวทานอลที่มีความเข้มข้นสูงมาก จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำลายคุณสมบัติในการรักษาความเป็นกรดด่างของเซลล์ โดยจะยับยังการใช้น้ำตาลของเซลล์และยังทำให้ระดับ ATP ต่ำลง (Linda และ Ellefson, 1985) ซึ่งปริมาณความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีผลต่อการย่อยตัวเอง (autolysis) แต่ไม่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ อยู่ในช่วง 7-16 กรัมต่อลิตร การทำให้เซลล์มีความคงทนต่อปริมาณ

ความเข้มข้นของบิวทานอลที่สูงขึ้นโดยมีผู้ทำการทดลองโดยการฉายแสงอุตาไวโอเลตทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ (Grott schall และ Bahl, 1981)

2.5.12 สูตรอาหาร

การกำหนดสูตรอาหารเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมัก โดยสูตรอาหาร ต้องธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การสร้างสารเมแทบอไลท์ และการรักษาสภาพของเซลล์ อาจใช้ข้อมูลดังตารางที่ 2.3 ต่อไปนี้มนการประมวลผลปริมาณของธาตุต่างๆ (สมใจ ศิริโภค, 2555)

ตารางที่ 2.5 แสดงองค์ประกอบของธาตุต่างๆที่พบใน จุลินทรีย์ (ร้อยละน้ำหนักแห้ง) (Stanbury และ Whitaker, 1984**)**

Element	**Bacteria**
Carbon	50-53
Hydrogen	7
Nitrogen	12-15
Phosphorus	2.0-3.0
Sulphur	0.2-1.0
Potassium	1.0-4.5
Sodium	0.5-1.0
Calcium	0.01-1.1
Magnesium	0.1-0.5
Chloride	0.5
Iron	0.02.0.2

การกำหนดสูตรอาหารที่ดีนั้นจะต้องมีการประมาณความจำเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน หรือแม้แต่ปริมาณวิตามิน และแร่ธาตุที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และการผลิตผลิตภัณฑ์ ดังงานวิจัยของ อังคนา (2553) โดยทำการเปรียบเทียบสูตรอาหาร 2 สูตร ซึ่งมีการปรับสัดส่วนของ วิตามิน, แร่ธาตุ, อินทรีย์ และอนินทรีย์ไนโตรเจน ผลปรากฏว่าสูตรอาหารที่

1 และสูตรอาหารที่ 2 ให้ปริมาณของบิวทานอล เท่ากับ 0.35 และ 3.81 ตามลำดับ ส่วนงานวิจัยของนันทนัช และคณะ มีการปรับเปลี่ยนปริมาณ และชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยจากงานวิจัยแสดงว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อปริมาณบิวทานอลโดยตรง

2.6 การใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์

น้ำตาลมีความสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตตัวทำละลาย โดยขึ้นกับชนิดของน้ำตาลซึ่งน้ำตาลแต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน ดังเช่นการใช้น้ำตาลซูโคสของจุลินทรีย์กลุ่มครอสตริเดียม *C. acetobutylicum* ATCC 824 ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเพียงชนิดเดียว พบว่า มีการสร้างเอนไซม์ซูเครสของระบบ PEP-dependent phosphotransferase system รวมทั้งเอนไซม์ฟลุคโตไคเนส (fructokinase) ในระบบ ATP-dependent phosphorylation ของฟรุคโตส ขึ้นมาตามลำดับ และส่วนในแหล่งอาหารทีมีการใช้น้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครสไม่มีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เบื้องต้นโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารซูโครสก่อน แล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารใหม่ (กลูโคสและซูโครส) และพบว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มคลอสตริเดียมยังสามารถใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น 23-25 แมนโนส 4.5-5.2 อาราบิโนส 9.2-10.3 และ ไซโลส 18-20 กรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นลำดับแรกของการหมักรองลงมาคือ การใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ แต่ก็ขึ้นกับชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย (Lee, 2005 และ Tangney, 2000)

จิรกานต์ และคณะ (2544) ศึกษาเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยการใช้ความเข้มน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการย่อยสลายจากย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังสด และผักตบชวา ด้วยเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง ในช่วง 4.5-5.5 พบว่าปริมาณบิวทานอลได้ 8.94, 7.62 และ 5.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ชุติมณฑน์ และคณะ (2552) ศึกษาเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยการใช้ความเข้มน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยผักตบชวาอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถผลิตบิวทานอลได้ 10.43 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง

อังคณา และคณะ (2553) ศึกษาเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยน้ำอ้อยที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส และซูโครส ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ บิวทานอล 15.35 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ดังนั้นการให้ปริมาณที่เหมาะสมของน้ำตาลจึงมีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์ เพราะถ้าให้ความเข้มข้นน้ำตาลน้อยเกินไปจุลินทรีย์ก็จะใช้น้ำตาลได้หมด แต่ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้อยู่

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องกวน (stirrer) รุ่น RW 20 ZM.n. ของบริษัท lka labortechnik, Germany

3.1.2 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ Controlled Environment Incubator Shaker New Brunswich Scientific Co., U.S.A.

3.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) Kubota 7820, Kubota Corporation, Japan

3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) BOECO U-320, Boeckel Corporation, Germany

3.1.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan

3.1.6 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) MP220, Mettler Toledo, Switzerland

3.1.7 เครื่องวิเคราะห์น้ำตาล (Industrial Analyzer YSI Model 27) Yellow Springs Instrument Co., U.S.A.

3.1.8 เครื่องและอุปกรณ์วัดโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah method

Distillation Unit Nitrogen analyzer รุ่น BUCHI 339

Digestion Unit รุ่น BUCHI K 435

Control Unit รุ่น BUCHI B 436

Scrubber Unit รุ่น BUCHI B 414

3.1.9 ตู้อบ (Hot Air Oven) ULM 500, Memmert, Germany

3.1.10 ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 1 ลิตร Biostat Q®, B Braun Biotech International, Germany

3.1.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) SS-325, TOMY, Japan

3.1.12 Vertical Laminar flow VS-124, ISSCO, U.S.A.

3.1.13 เครื่องชั่ง

3.1.14 Hood

3.1.15 ตู้แช่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.16 แก๊สโครมาโทการฟี่ (shimadzu model Gc 7AG, Japan)

3.1.17 Vortex mixer

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 กรดซัลฟิวริค (H_2SO_4) (Fisher Chemical)

3.2.2 กรดบิวทิริค (Butyric acid) (Merck,)

3.2.3 กรดบอริค (H_3BO_3) (MAY & Baker LTD., England)

3.2.4 กรดอะซิติค (Acetic acid) (May & Baker,British)

3.2.5 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (BDH laboratory, England

3.2.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)

3.2.7 ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.8 น้ำตาลซูโครส (Ajax Finechem, Australia)

3.2.9 น้ำอ้อยไม่ใส่สารกันบูด

3.2.10 บิวทานอล (n-Butanal) (May & Baker, British)

3.2.11 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.12 เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.13 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.14 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.15 แอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.16 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (Himedia , India2)

3.2.14 สารสกัดเอนไซม์เคซิน (Tryptone) (Himedia , India2)

3.2.15 Reinforced Clostridial Medium (Himedia , India2)

3.2.16 อะซิโตน (Acetone) (May & Baker, British)

3.2.17 เอทานอล (Ethanol) (May & Baker, British)

3.2.18 Serenium reagent mixture (Merck, Germany)

3.2.19 การผงชูรส (Ajinomoto waste) จากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด

3.2.20 แอลไลซีน (L-Lysine) จากบริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

3.3.1 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 จาก American Type Culture Collection 12301 Pask Lawn Drive Rock, Maryland, U.S.A.

3.3.2 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 จาก American Type Culture Collection 12301 Pask Lawn Drive Rock, Maryland, U.S.A.

3.3.3 *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BAA 117 จาก American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

3.4 กระบวนการหมัก (The Fermentation Process)

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก

เริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced clostridium Medium (RCM) แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วรอให้เย็นในตู้ Vertical Laminar flow โดยใช้รังสียูวี (UV) ทำการฆ่าเชื้อ 1-2 ชั่วโมง ในขณะเดียวกัน นำกล้าเชื้อที่ผ่านการเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้ว นำมาแช่งในถังน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที 5 นาที เพื่อให้อาหารอยู่ในสภาวะไรออกซิเจน(ในตู้ปลอดเชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่ ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ความเร็วรอบ 115 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อระดับขวดเขย่าก่อนลงถังหมัก

เริ่มเตรียมอาหารตามสูตรอาหารใน ตารางภาคผนวก ก ปริมาณ 60 มิลลิลิตร โดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วฆ่าเชื้อโดยรังสียูวี 1-2 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที 10-15 นาที โดยถ่ายเชื้อร้อยละ 10 โดยปริมาตร ที่ได้จากกขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ ลงในอาหารที่เตรียมไว้ หลังจากนั้น นำไปเขย่าความเร็วรอบ 115 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

3.4.3 กระบวนการหมักในถังหมัก 1 ลิตร

เริ่มเตรียมอาหารตามสูตรอาหารในตารางภาคผนวก ก ปริมาณ 600 มิลลิลิตร ในถังหมัก 1 ลิตร แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที และอีกส่วนหนึ่งเตรียมน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ต้องการแล้วนำไปนึ่ง อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในตู้ (Vertical Laminar flow) พร้อมทั้งฆ่าเชื้อโดยรังสียูวี 1-2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทำการผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน แล้วทำการผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที 20 นาที โดยถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นโดยปริมาตรจากการเตรียมกล้าเชื้อระดับขวดเขย่าก่อนลงถังหมักตามสูตรอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปประกอบกับชุดการหมัก (fermentor) โดยมีตัวแปรควบคุมดังนี้ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

3.5 ศึกษาชนิดของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล

เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตตัวทำละลายของคลอตริเดียม 3 สายพันธุ์ คือ *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. acetobutylicum* ATCC 4259 และ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามอาหารสูตรที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์, เซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ด้วยกระบวนการแบบการหมักแบบกะในถังหมัก 1 ลิตร

3.6 ศึกษาผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณบิวทานอล

ศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล ได้แก่ สกัดยีสต์ (Yeast extract), กากผงชูรส (Ajinomoto waste), แอลไลซีน (L-Lysine) และแอมโมเนียมอะซิเตต (Ammonium acetate)

3.6.1 ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดเดียว

ใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เท่ากับสูตรอาหารที่ 1 คือ 1.468 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้คือ สารสกัดยีสต์, กากผงชูรส และแอลไลซีน จึงมีความเข้มข้นเท่ากับ 13.382, 29.301 และ19.573 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3.6.2 ศึกษาการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับอนินทรีย์ไนโตรเจน

ใช้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เท่ากับสูตรอาหารที่ 1 คือ 0.923 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร โดยชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้คือ สารสกัดยีสต์, กากผงชูรส และแอลไลซีน จึงมีความเข้มข้นเท่ากับ 8.496, 18.423 และ12.306 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต 3กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 5 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

3.7 การเตรียมตัวอย่างน้ำหมักก่อนทำการวิเคราะห์

ตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร และหลังจากกระบวนการหมักเสร็จสิ้น แล้วเก็บตัวอย่างน้ำหมักแยกใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที 20 นาที จะได้ ส่วนที่เป็นของเหลว และของแข็ง ในการปั่นเหวี่ยงครั้งแรก แยกเก็บของเหลว ไว้สำหรับวิเคราะห์ น้ำตาล ตัว

ทำละลาย และกรดส่วนของแข็งที่ได้ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ หลังจากนั้นเติมน้ำ DI ให้ได้ ปริมาตรเหมือนเท่าเดิม แล้วปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง เพื่อเก็บเซลล์มาวิเคราะห์ความเข้มข้น

3.8 การวิเคราะห์ปริมาณ กรดบิวทิริก กรดอะซิติก บิวทานอล เอทานอล และอะซิโตน

การหาปริมาณกรด และตัวทำละลาย โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทการฟี โดยใช้ คอลัมน์ยาว 1 เมตร ขนาด 1/8 นิ้ว ที่บรรจุด้วย porapak Q 60/80 mesh โดยที่อุณหภูมิคอลัมน์ 180 องศาเซลเซียส แล้วใช้อุณหภูมิอินเจคเตอร์ (injecter) 280 อุณหภูมิดีเทคเตอร์ (detector) 230 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดเข้าเครื่อง 5 ไมโครลิตร การหาความเข้มข้นของตัวอย่างสารที่เก็บได้หาจากการสมการที่มีความสัมพันธ์กันโดยพล๊อตระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ของกรดและตัวทำละลายมาตรฐาน โดยที่พื้นที่ของสารตัวอย่างดูจากรีเทนชันไทม์ (retention time) ของสารต่างๆ ดังนี้ กรดบิวทิริค กรดอะซิติก บิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล 8.58, 1.95, 3.8, 1.2 และ 0.866 ตามลำดับ

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณของเซลล์

สารละลายที่เก็บได้จากชั่วโมงสุดท้าย 20 มิลลิลิตร ทั้งหมด 2 หลอด มาเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) เสร็จแล้ว จากนั้นเซลล์ที่เก็บเอาไว้ 20 มิลลิลิตร หนึ่งหลอดมาทำน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) โดยเทใส่ถ้วยอลูมิเนียมฟอยด์แล้วทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccators) โดยนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึง 0.001 มิลลิกรัม จนได้น้ำหนักของเซลล์คงที่ เมื่อค่าที่ได้จากการชั่งน้ำหนักเซลล์ก็สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของมวลเซลล์ได้ อีกหลอดหนึ่งใช้ทำความเข้มข้นของเซลล์มาตรฐาน แล้วทำการมาตรฐานจากจากวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายที่เก็บจากถังหมักทุก 6 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการเตรียมแล้วตามหัวข้อที่ 3.7วัดค่าการดูดกลืนแสง เมื่อได้ค่าจากการวัดแล้วจากนั้นนำมาคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ของแต่ละตัวอย่าง

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาล

การหาปริมาณน้ำตาลสามารถหาได้ด้วยวิธีการ 2 ด้วยกัน คือ การวิเคราะห์ด้วยวิธี ดีเอ็นเอส (DNS) และ การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง วายเอสไอ (YSI) โดยกระบานการเตรียมสารเริ่มต้นของทั้งสองวิธีเหมือนกัน โดยเริ่มแรกมีการเตรียมสารมาตรฐาน นำน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ทำการอบที่

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปใส่ไว้ในโถดูดความชื้น รอจนกว่า น้ำตาลซูโครสอุณหภูมิลดลง แล้วนำซูโครสที่ได้มาทำสารละลายมาตรฐาน โดยทำการเตรียมความเข้มข้น 5 ความเข้มข้นร้อยละ 0, 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 เปอร์เซ็นโดยมวลต่อปริมาตร

กระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) น้ำตาลซูโครส เริ่มต้นโดยการนำสารละลายมาตรฐาน และ สารตัวอย่าง ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำ DI 0.8 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.5 มิลลิลิตร 37% กรดไฮโดรคลอริก (HCL) นำไปต้มที่อ่างน้ำร้อน (Water bath) 10 นาที หลังจากนั้น ทำการหยุด ปฏิกิริยาด้วยการนำสารละลายมาตรฐาน และ สารตัวอย่างแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติม 0.5 มิลลิลิตร 20% สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ทำให้ผสมเข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ถ้ามีตะกอนให้เอาไปหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย การวิเคราะห์ด้วยวิธี ดีเอ็นเอส หรือการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง วายเอสไอ

3.10.1 วิธี ดีเอ็นเอส (DNS)

การเตรียมสารละลาย ดีเอนเอส โดย ละลาย 1.633 ของ 98% สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มวลโดยมวล ใน 20 มิลลิลิตร ของ น้ำ DI ทำการผสมให้เข้ากัน โดยใช้ เครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) ในขณะผสมสารละลายทำการเพิ่ม 1 กรัม ของ 3,5-dinitrosalicylic acid powder ในสารละลาย ทำการเจือจางโดยการเติม น้ำ DI 50 มิลลิลิตร แล้วกวนผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน เติม 30 กรัม Na-K tartrate ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ก่อนใช้ 3 วัน

การวิเคราะห์กระทำโดย นำสารละลายที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิส ทั้งสารละลายมาตรฐาน และสารตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เติม 1 มิลลิลิตร สารละลาย ดีเอ็นเอส ในหลอดทดลองแล้วทำไปต้ม 10 นาที ใน อ่างน้ำร้อน หลังจากนั้น นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติมน้ำ DI 10 มิลลิลิตร เมื่อเสร็จขั้นตอนการเตรียมการวิเคราะห์ข้างต้น ทำการวิเคราะห์ด้วย เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) UV-2450, Shimadzu, Japan ที่ความยาวเคลื่อน 520 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 0% เป็น Blank สามารถได้กราฟมาตรฐาน โดยการพล๊อตระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสง กับความเข้มข้น จากนั้นจึงจะสามารถคำนวณหา ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ โดยเทียบค่าการดูกลืนแสง

3.10.2 วิธี การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง วายเอสไอ (YSI)

นำสารละลายที่ได้จากกระบวนการ โฮโดรไลซิส มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์น้ำตาล (Industrial Analyzer YSI Model 27) Yellow Springs Instrument Co., U.S.A. โดยใช้เมมเบรน สำหรับ น้ำตาล ดี-กลูโคส (D-glucose) เมมเบรน 1 ชิ้นสามารถใช้สำหรับการวิเคราะห์ได้ 30 วัน การวิเคราะห์สร้างกราฟมาตรฐานโดยสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ ทั้ง 5 ความเข้มข้น โดยทำการพล๊อตกราฟระหว่าง ความเข้นข้นน้ำตาลกลูโคสกับ ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ ที่อ่านได้จากเครื่อง แล้วสามารถคำนวณหา ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้โดยเทียบปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์

3.11 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยเครื่อง และอุปกรณ์วัดโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah method โดยใช้ Distillation Unit Nitrogen analyzer รุ่น BUCHI 339, Digestion Unit รุ่น BUCHI K 435, Control Unit รุ่น BUCHI B 436 และScrubber Unit รุ่น BUCHI B 414 โดยเริ่มจากการนำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ไนโตรเจน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อยโปรตีนแล้วเติมซีรีเนียม (Serenium reagent) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยโปรตีนจะสังเกตได้ว่าเป็นสารละลายสีน้ำเงิน จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปใส่เครื่องย่อยอุณหภูมิในช่วง 200 -360 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วทิ้งให้เย็น สังเกตดูสีสารละลายในหลอดย่อยโปรตีนพบว่าเป็นสารละลายใสไม่มีสี ขั้นตอนต่อใส่ในเครื่องกลั่น โดยเครื่องกลั่นจะทำการไทเทรตหาปริมาณโปรตีน โดยกระบวนการภายในเครื่องกลั่น มีการเติมน้ำกลั่นลงไป 30 มิลลิลิตร เพื่อเจือจากกรด และเครื่องจะเติมสารละลายกรดบอริก ปริมารณ 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็นตัวทำละลาย แอมโมเนียที่เกิดจากปฏิกิริยาในการย่อย และเติม 30 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเครื่องจะทำการไทเทรตด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.024 นอร์มัล ซึ่งจุดยุติของการไทเทรต อยู่ค่าความเป็นกรดด่างของกรดบอริก คือ 4.65 โดยสมการการคำนวณหาเปอร์เซ็นไนโตรเจนสามารถคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\textbf{ร้อยละของไนโตรเจน} = (1.4007 \times N_{H2SO4} \times V_{H2SO4}) / V_{Sample}$$

N_{H2SO4} = ความเข้มข้นนอร์มัลลิตี้ของกรดซัลฟิวริคที่ใช้ไตเตรท

V_{H2SO4} = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริคที่ใช้ไตเตรท

V_{Sample} = ปริมาตรของสารตัวอย่าง

บทที่ 4
ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกะของสายพันธุ์จุลินทรีย์

กระบวนการหมักบิวทานอล เป็นการหมักตัวทำละลายที่ให้พลังงาน ในการเผาไหม้ใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซิน (เบนซิน 32 และ บิวทานอล 29.2 เมกะจูลต่อลิตร) ดังงานวิจัยของ Sang และคณะ (2008) เพื่อให้ได้ปริมาณบิวทานอลมีมากพอต่อความต้องการในอนาคต จึงมีความพยายามศึกษาประสิทธิภาพของสายพันธุ์จุลินทรีย์ และชนิดแหล่งอาหารที่เหมาะสม จากงานวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับกระบวนการหมักของจุลินทรีย์สายพันธุ์คลอสตรีเดียม มาผลิตตัวทำละลาย แม้ว่าจะได้ปริมาณความเข้มข้นของบิวทานอลที่สูง แต่ก็มีต้นทุนของแหล่งอาหารในการผลิตที่สูงเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลด้วยสายพันธุ์จุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ เช่น *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium saccharobutylicum* ATCC BAA 117 โดยใช้สูตรอาหารตามงานวิจัยของ อังคณา (2010) เป็นฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตตัวทำละลาย จากน้ำอ้อย โดยการแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลรีดิวซ์) ที่ 60 และ 80 กรัมต่อลิตร

4.1.1 การผลิตบิวทานอลโดยเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

แหล่งคาร์บอนมีผลต่อจุลินทรีย์โดยตรงทั้งการเจริญเติบโต และการผลิตผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จึงต้องการปริมาณที่เหมาะสม โดยแหล่งคาร์บอนที่งานวิจัยนี้ให้ความสนใจ คือ น้ำอ้อย (Sugarcane juice) เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลหลายชนิด เช่น กลูโคส, ซูโครส แล้วอุดมไปด้วยวิตามิน, แร่ธาตุ และประกอบกรดอะมิโนเป็นจำนวนมาก (SN WALFORD, 1996) และเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีปริมาณสูงมากภายในประเทศ ดังนั้นมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งต่อการหมัก อะซิโตน บิวทานอล เอทานอล

การศึกษาความเหมาะสมของปริมาณน้ำตาลกระบวนการหมักต่อเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 2 ความเข้มข้น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ด้วยสูตรอาหารที่ 1 โดยตัวแปรควบคุมในการทดลองคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ โดยสภาวะไร้ออกซิเจน ดังรูปที่ 4.1-4.7

ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของเชื้อคลอสตริเดียม พบว่า เชื้อสามารถใช้น้ำตาลหมดภายใน 72 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดเซลล์สูงสุด 6.94 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกเซลล์เริ่มมีการปรับตัว จากนั้นในช่วง

ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตของสูงสุด (exponential phase) ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลในกระบวนการหมักลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการผลิตกรดบิวทิริก และอะซิติก 5.53 และ 5.95 กรัมต่อลิตร จึงทำให้ร้อยละผลได้กรดรวมมีค่าสูงเป็น 18.35 โดยในช่วงที่กรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจัดเป็นระยะการสร้างกรด ส่วนในช่วงกระบวนการผลิตตัวทำละลายจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย โดยให้ร้อยละ ผลได้ตัวทำละลายรวมเป็น 11.33 และผลิตตัวทำละลายรวมมีค่าเท่ากับ 7.09 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วย บิวทานอล 5.20 กรัมต่อลิตร อะซิโตน 1.43 และเอทานอล 0.46 กรัมต่อลิตร) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณกรดบิวทิริก และอะซิติกเพียง 2.90 และ 3.60 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร จนกระทั่งกระบวนการหมักเสร็จสิ้นมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเพียง 16.59 กรัมต่อลิตร ในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมัก เซลล์ยังมีการปรับสภาพต่อความเข้มข้นน้ำตาล จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 18 มีมวลเซลล์มากสุดเท่ากับ 5.56 กรัมต่อลิตร ส่วนระยะการผลิตตัวทำละลาย เซลล์สามารถผลิตทำละลายรวมได้ถึง 13.56 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วย บิวทานอล 8.51 กรัมต่อลิตร, อะซิโตน 3.51 และเอทานอล 1.54 กรัมต่อลิตร) และให้ร้อยละผลได้ตัวทำละลายรวมเป็น 21.02 แสดงว่าปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมกับเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ 96 ชั่วโมง แล้วมีปริมาณกรดบิวทิริก และอะซิติกเหลืออยู่เพียง 1.34 และ 1.56 ตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลทั้งสองความเข้มข้น ดังรูปที่ 4.5 ปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถผลิตบิวทานอลสูงว่า 1.6 เท่า เนื่องความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลไม่เพียงพอสำหรับขั้นตอนการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายจึงทำให้ผลิตตัวทำละลายได้น้อย และมีกรดเหลือเป็นจำนวนมาก รูปที่ 4.6 และอีกเหตุผลหนึ่ง เพราะว่า มีการผลิตกรดในปริมาณสูงถึง 1.8 เท่า จึงมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ให้ผลิตตัวทำละลายได้น้อยลง

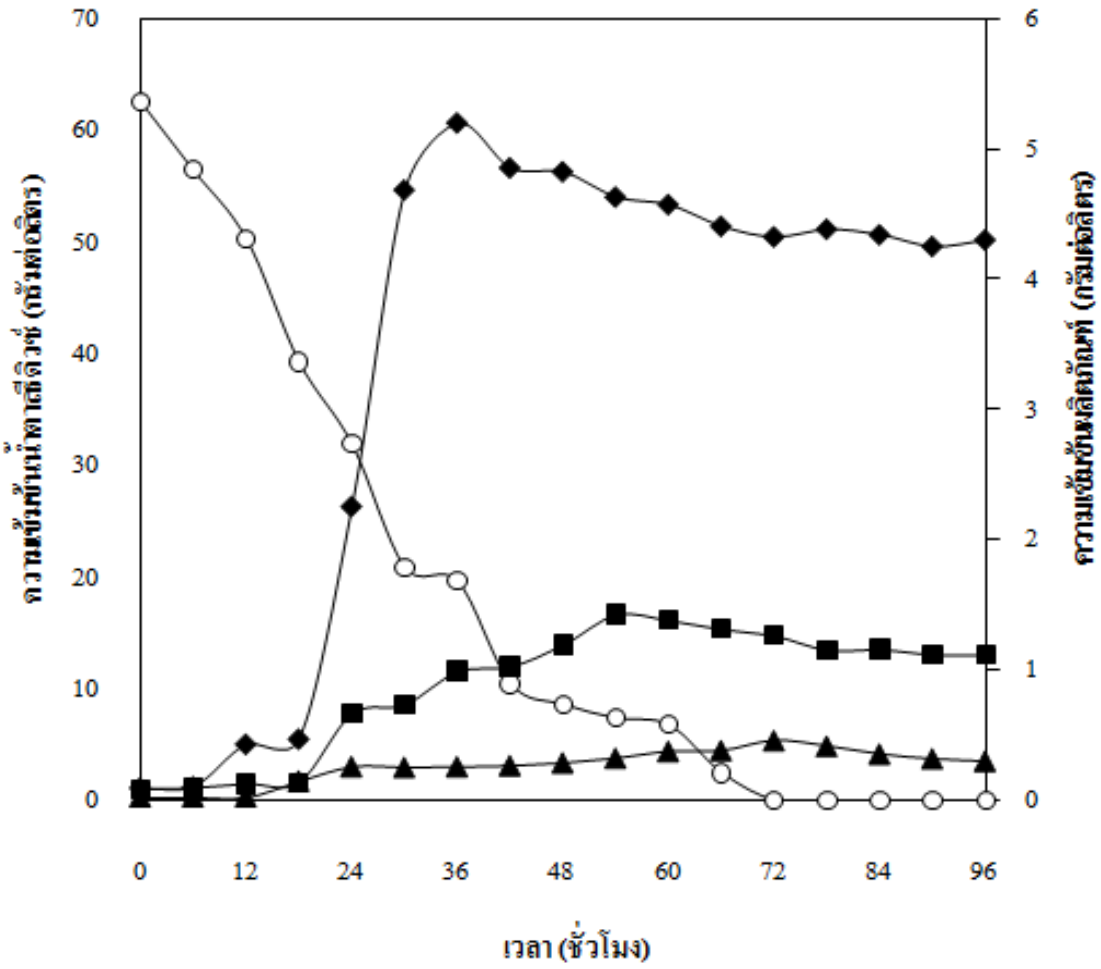
เมื่อพิจารณาถึงค่าจลนศาสตร์ของการหมักเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่สภาวะทั้งสอง จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) มีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นเซลล์สูงสุด และผลได้เซลล์ (ตารางที่ 4.1) พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ จะให้ค่าต่ำกว่า คือ มีค่าเป็น 6.94 กรัมต่อลิตร และร้อยละ 11.09 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นมวลเซลล์มีค่าลดลง

ส่วนการสร้างกรดรวมของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่า จะให้ค่า ν_{ac} และ Q_{ac} มีค่าสูงกว่าเป็นสองเท่าของค่าที่ไดรับจากการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง โดยความเข้มข้นของกรดรวมสูงสุดที่ได้ (ตารางที่ 4.1) มีค่าเป็น 11.48 กรัมต่อลิตร และส่วนผลได้กรดรวมเป็นร้อยละ 18.35 โดยค่าพารามิเตอร์ทั้งสองค่า คิดเป็น 1.8 เท่า ของค่าที่ได้จากอีกสภาวะ ซึ่งการสร้างผลิตภัณฑ์กรดจะเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโต (Growth associated product) ดังนั้นมวลเซลล์ที่จะทำให้สามารถผลิตกรดรวมได้ความเข้มข้นสูงเช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตตัวทำละลายรวม พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลสูง จะให้การผลิตที่ดีกว่า โดยมีค่า Q_{sol} เป็น 0.147 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ มีค่าสูงเป็น 1.5 เท่า ของค่าที่ได้จากอีกสภาวะ ส่วน ν_{sol} เป็น 0.054 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง หรือ คิดเป็น 2.3 เท่าของเมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะให้ความเข้มข้นตัวทำละลายรวม (13.56 กรัมต่อลิตร) และค่าผลได้ตัวทำละลายรวม (ร้อยละ 21.02) ที่มีค่าสูงเป็นสองเท่าของค่าที่ได้จากอีก

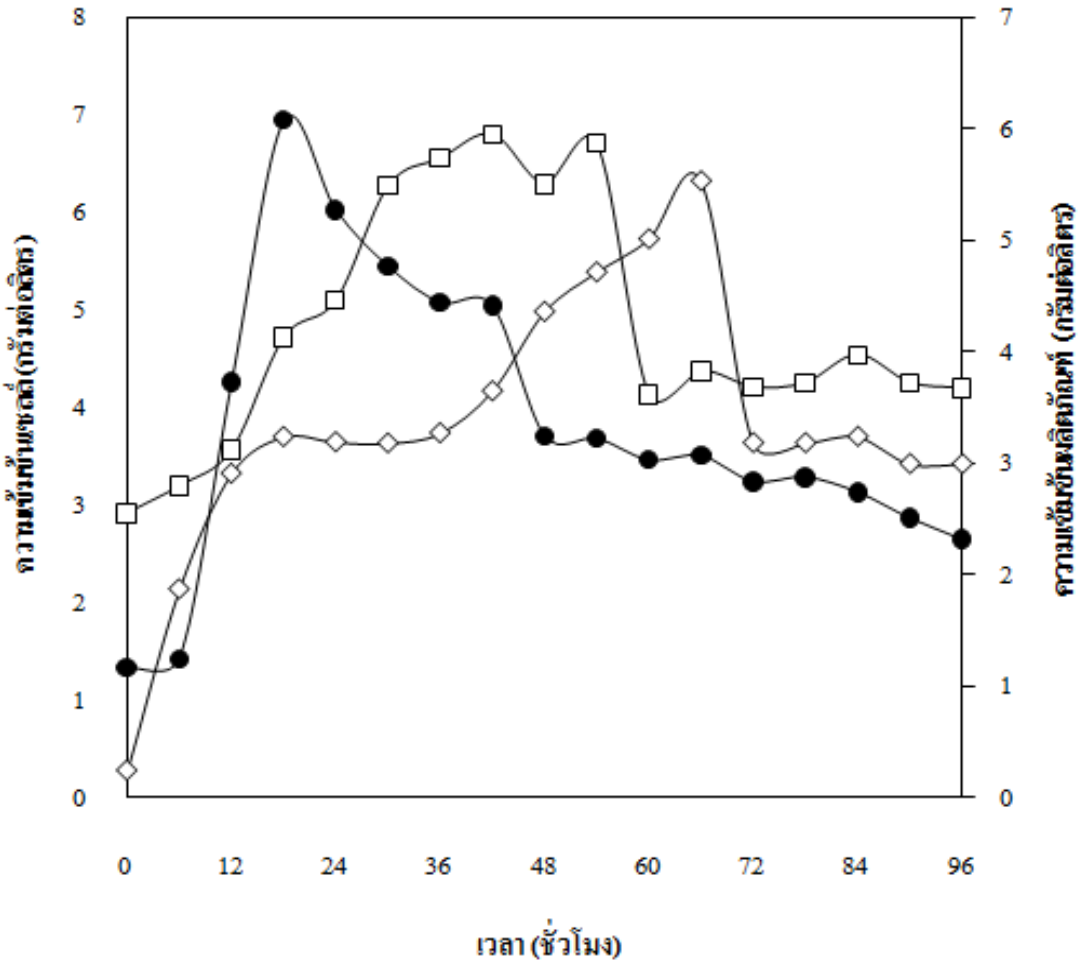
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตตัวทำละลายรวม พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลสูง จะให้การผลิตที่ดีกว่า โดยมีค่า Q_{sol} และ ν_{sol} เป็น 0.147 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.054 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ หรือ มีค่าสูงเป็น 1.5 เท่า และ 2.3 เท่า เมื่อเทียบค่าที่ได้จากที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่า (60 กรัมต่อลิตร) โดยที่สภาวะนี้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายได้อย่างดี จึงทำให้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก จะให้ความเข้มข้นตัวทำละลายรวม (13.56 กรัมต่อลิตร) และค่าผลได้ตัวทำละลายรวม (ร้อยละ 21.02) ที่มีค่าสูงเป็นสองเท่าของผลผลิตที่ได้จากอีกสภาวะหนึ่ง

ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 คือ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย อังคณา (2010) และนันทนัช (2011) มีได้รายงานถึงการสร้างตัวทำละลายของเชื้อชนิดนี้ว่า สามารถใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยผลิตตัวทำละลายรวมอยู่ในช่วง 64.51-78.58 กรัมต่อลิตร

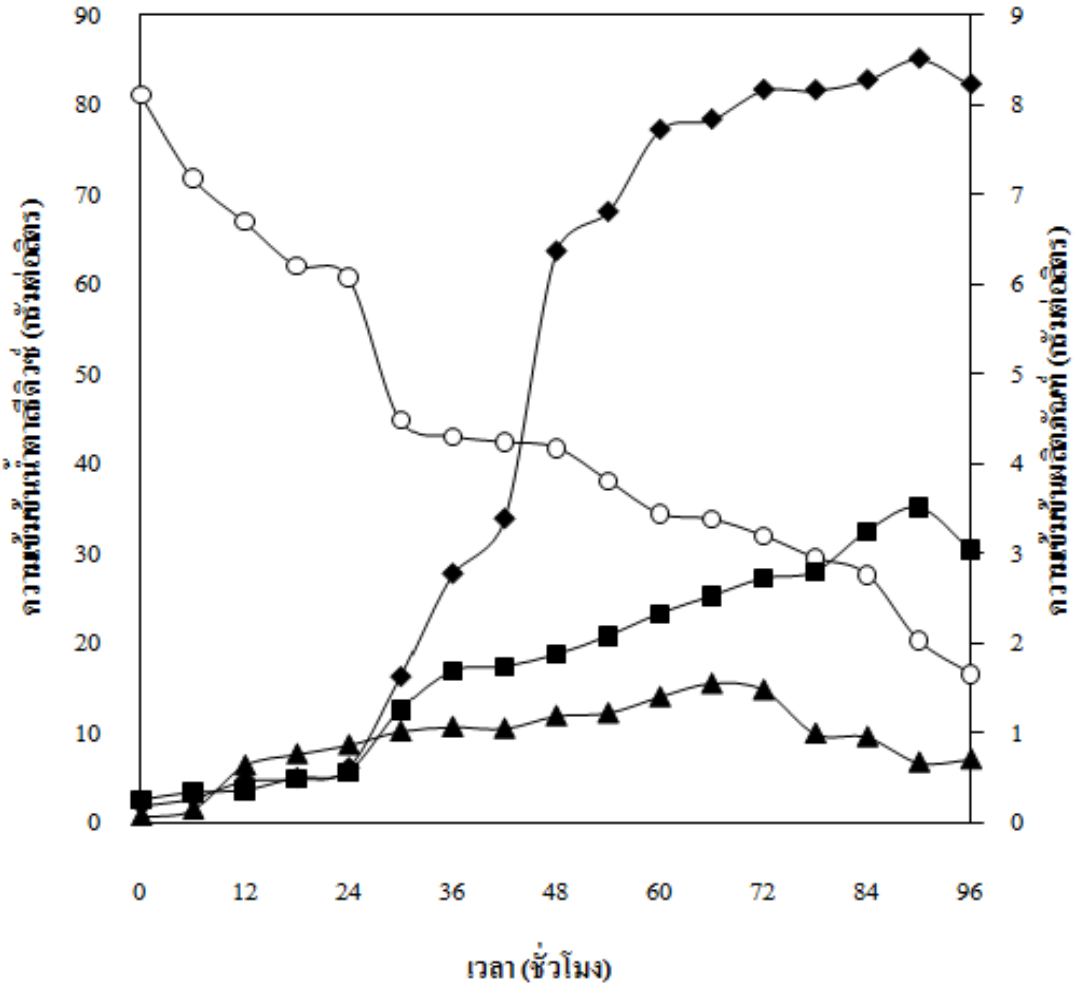


รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

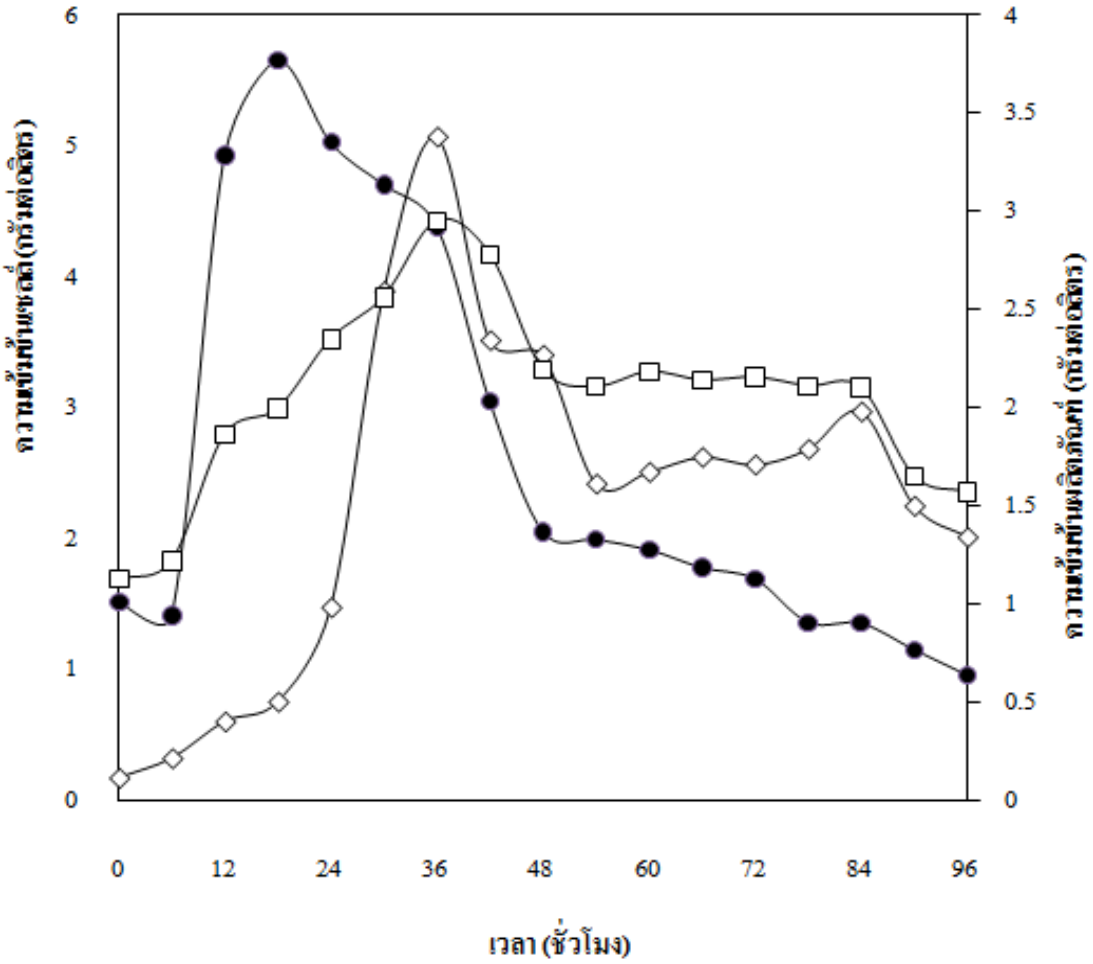


รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



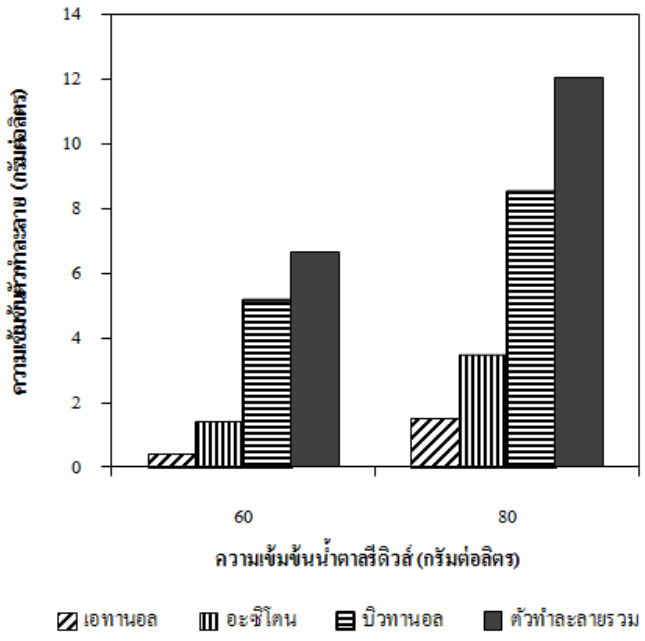
รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

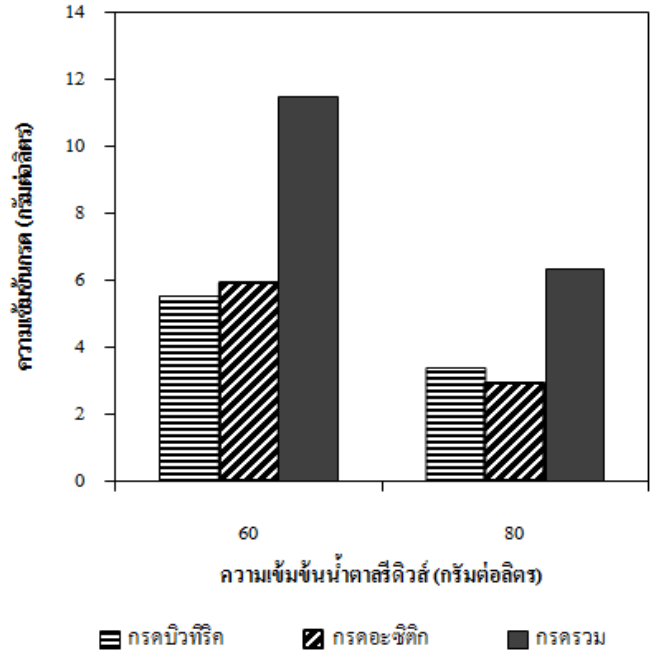


รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

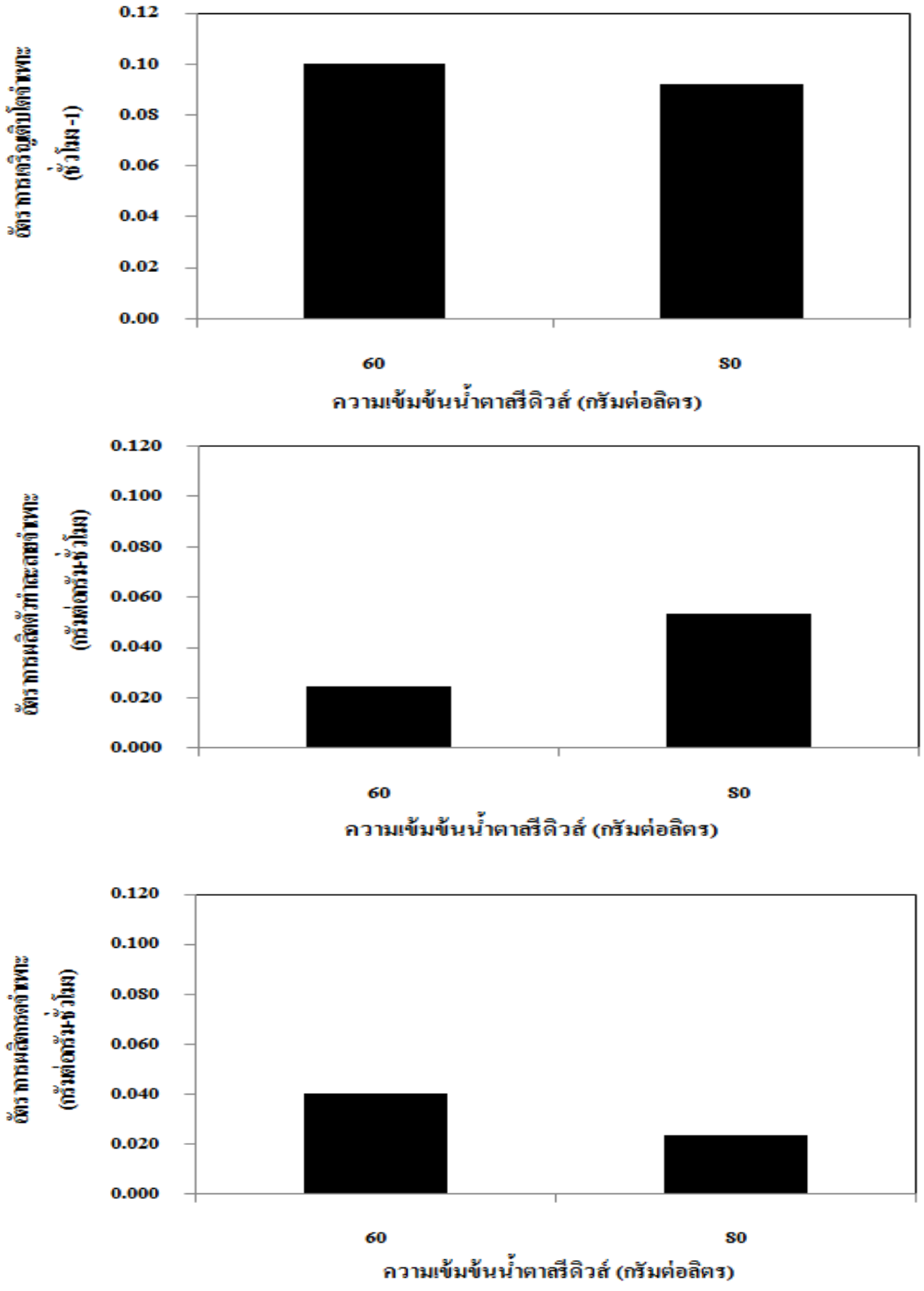
● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก



รูปที่ 4.5 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.6 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.7 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด 5.0

ตารางที่ 4.1 ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะโดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
	60	80
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	1.43	3.51
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	5.2	8.51
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.46	1.54
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	7.09	13.56
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	5.53	3.38
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	5.95	2.95
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	11.48	6.33
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	62.56	81.1
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	62.56	64.51
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	6.94	5.56
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	8.31	13.19
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	11.33	21.02
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	18.35	9.81
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.07	0.08
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.10	0.15
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.24	0.10
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.10	0.092
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.026	0.037
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.024	0.054
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.040	0.024

4.1.2 การผลิตบิวทานอลของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259

จุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ มีรายงานวิจัยว่า สามารถผลิตตัวทำละลายได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์*C. acetobutylicum* ATCC 824 (Shaheen และคณะ, 2000) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษา โดย

ใช้สูตรอาหารที่ 1 ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สภาวะไร้ออกซิเจน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.8-4.14

ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร *C. acetobutylicum* ATCC 4259 เซลล์สามารถใช้น้ำตาลได้เพียง 34.66 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากการพิจารณาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงเริ่มต้นเซลล์ พบว่า เซลล์สามารถใช้น้ำตาลได้โดยไม่ต้องมีระยะการปรับตัว (lag phase) ส่งผลให้เซลล์สามารเจริญเติบโตสูงสุดถึง 10.35 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.9 ช่วงการสร้างกรดเซลล์สามารถใช้น้ำตาลผลิตกรดได้สูง ส่งผลให้ร้อยละผลได้กรดรวมเป็น 37.39 แล้วมีปริมาณกรดรวม 12.96 กรัมต่อลิตร (กรดบิวทิริก 5.27 และกรดอะซิติก 7.29 กรัมต่อลิตร) ชั่วโมงที่ 24-78 กรดสองชนิดนี้ถูกใช้เพื่อผลิตตัวทำละลายทำให้ปริมาณกรดเริ่มลดลงอย่างคงที่ แล้วให้ร้อยละผลได้ตัวทำละลายรวมเป็น 40.65 และสามารถผลิตตัวทำละลายรวม 14.09 กรัมต่อลิตร (บิวทานอล 9.3, อะซิโตน 3.79 และเอทานอล 1 กรัมต่อลิตร) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีกรดบิวทิริก และอะซิติกเหลือเพียง 2.1 และ 5.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษา พบว่า เซลล์สามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการผลิตกรด และกระบวนการผลิตตัวทำละลายได้น้อยมาก แต่ให้ประสิทธิภาพต่อการผลิตกรดได้ในปริมาณสูง แล้วยังมีความสามารถเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายได้ในปริมาณสูงอีกเช่นกัน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 เซลล์สามารถใช้น้ำตาลในการผลิตกรดได้โดยไม่ต้องผ่านระยะการปรับตัว แม้ว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วเซลล์สามารถใช้น้ำตาลได้เพียง 24.76 กรัมต่อลิตร แต่สามรถเพิ่มมวลเซลล์ได้สูงถึง 9.64 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการสร้างกรดเซลล์สามารถผลิตกรดรวมได้ 10.0 กรัมต่อลิตร (กรดบิวทิริก 5.56 และกรดอะซิติก 7.69 กรัมต่อลิตร) จึงทำให้ร้อยละผลได้กรดรวมสูงถึง 40.63 หลังจาก 24 ชั่วโมง เซลล์เริ่มใช้กรดเพื่อเปลี่ยนเป็นผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จนกระทั่งให้ค่าร้อยละผลได้ตัวทำละลายรวมสูงถึง 36.55 (บิวทานอล 6.15 อะซิโตน 2.10 และเอทานอล 0.8 กรัมต่อลิตร) และมีกรดบิวทิริก และกรดอะซิติกเหลืออยู่เพียง 4.79 และ 5.37 กรัมต่อลิตร หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นทั้ง 2 ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ดังรูป 4.5-4.6 ปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 เพราะว่า ให้ปริมาณบิวทานอลสูงกว่า 1.51 เท่า แล้วมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาความเหมาะสมของความเข้มข้นของน้ำตาล พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัม

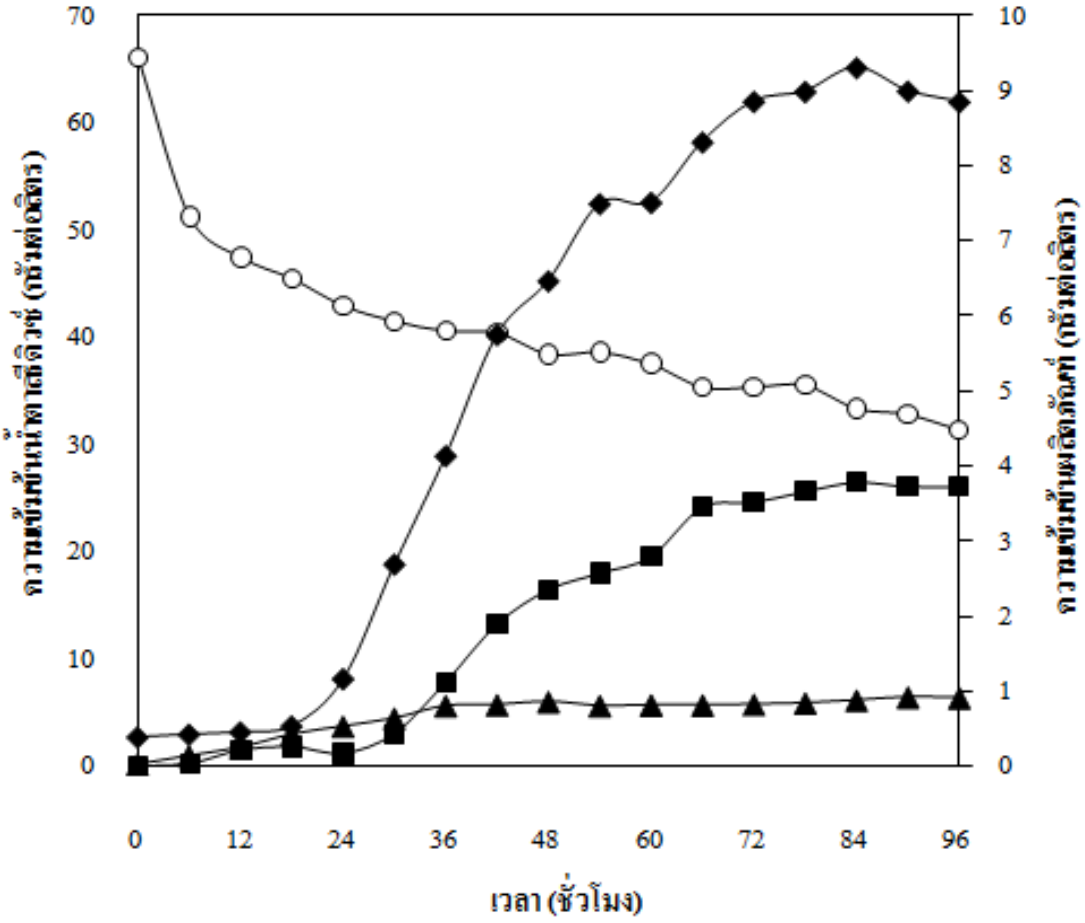
ต่อลิตร มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเซลล์ในกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ จึงมีผลต่อปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ที่เกิดขึ้นดังงานวิจัยของ T.C. Ezeji และคณะ (2004) เชื้อ *C. beijerinckii* BA101 ผลการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ทำให้มีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สูงขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงค่าจลนศาสตร์ของการหมักเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำ โดยให้ค่า μ สูงกว่าเป็น 0.030 ชั่วโมง$^{-1}$ รวมทั้งมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่มากกว่าเป็น 10.35 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จาการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง (ตารางที่ 4.2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลความเข้มข้นน้ำตาลที่สูง จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลง

เมื่อพิจารณาการสร้างกรดรวม พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่า จะให้ค่า ν_{ac} และ Q_{ac} มีค่าสูงกว่าค่าที่ไดรับจากการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงเช่นด้วยกัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.029 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง และ 0.26 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ตามลำดับ รวมทั้งให้ความเข้มข้นกรดสูงสุดเป็น 12.96 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อจะมีการผลิตกรดไปพร้อมกับการเจริญเติบโต (Growth associated product) ดังนั้นมวลเซลล์ที่สูงย่อมให้ปริมาณกรดที่สูงกว่า แต่อย่างไรก็ดี ค่าผลได้กรดรวมมีค่าต่ำกว่า คือ คิดเป็นร้อยละ 37.39 แสดงว่า การให้น้ำตาลของเซลล์เพื่อสร้างกรดได้มีประสิทธิภาพน้อยกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง

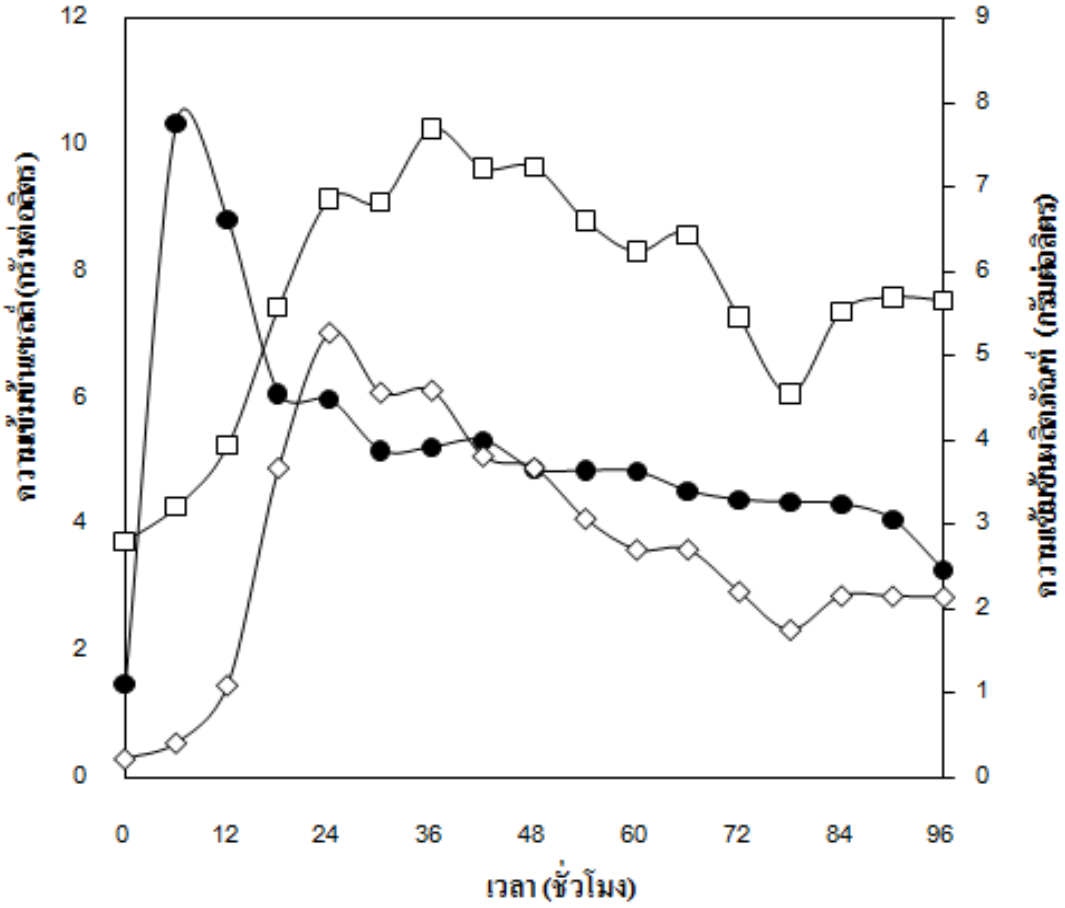
ในการผลิตตัวทำละลายรวมนั้น ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลต่ำกว่า จะให้ค่า ν_{sol} และ Q_{sol} ที่สูงกว่า คือมีค่าเป็น 0.151 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และ 0.030 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ เชื้อจุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างตัวทำละลาย โดยสามารถให้ความเข้มข้นตัวทำละลายรวมสูงสุดเป็น 14.09 กรัมต่อลิตร หรือ คิดเป็น 1.5 เท่า ของความเข้มข้นตัวทำละลายรวมสูงสุด ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลสูง รวมทั้งให้ค่าผลได้ตัวทำละลายรวมสูงกว่า โดยมีคิดเป็นร้อยละ 40.65 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง จะมีผลในการยับยั้งการผลิตตัวทำละลายของเซลล์ โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักความเข้มข้นของกรดที่เหลืออยู่ในระบบจะเหลืออยู่น้อยกว่าเช่นกัน คือ เหลือเพียง 7.812 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสม ในสูตรอาหารที่ 1 ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ ***C.*** *acetobutylicum* ATCC 4259 คือ 60 กรัมต่อลิตร เพราะให้การผลิตตัวทำละลายรวมสูงกว่า และยังสามารถใช้กรดในการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ



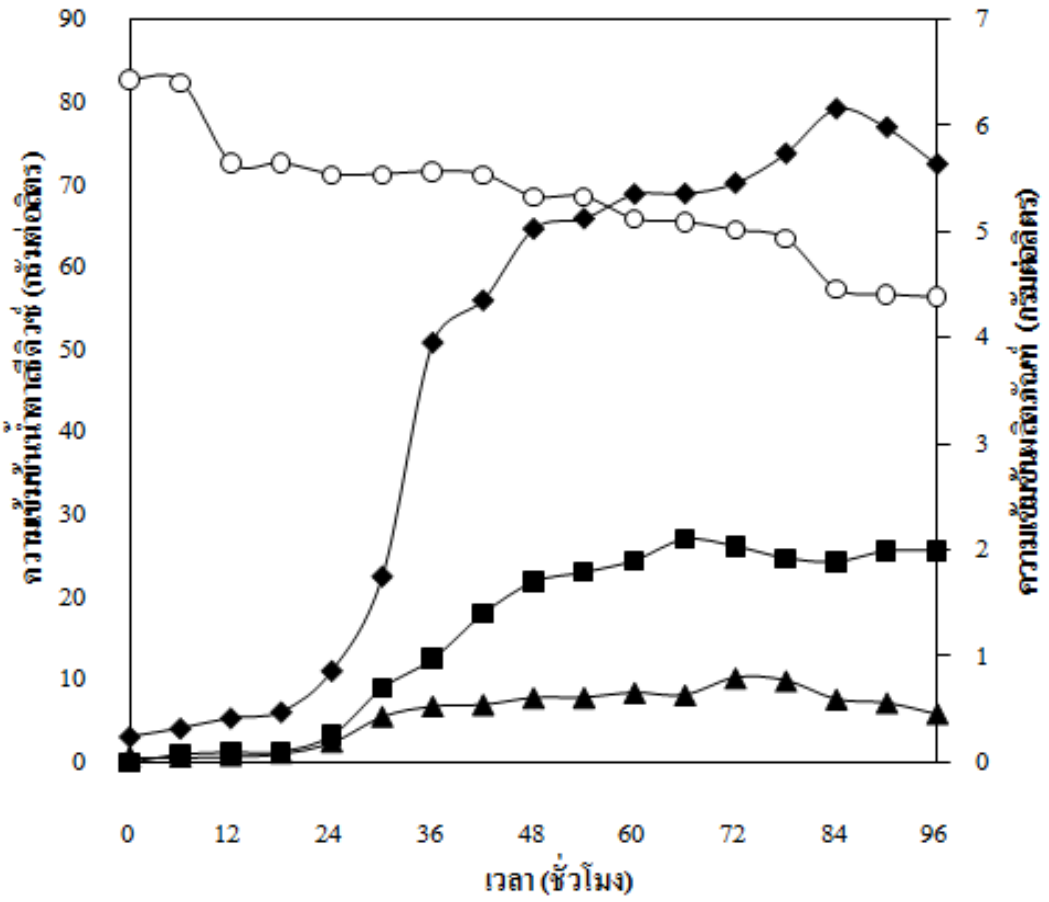
รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

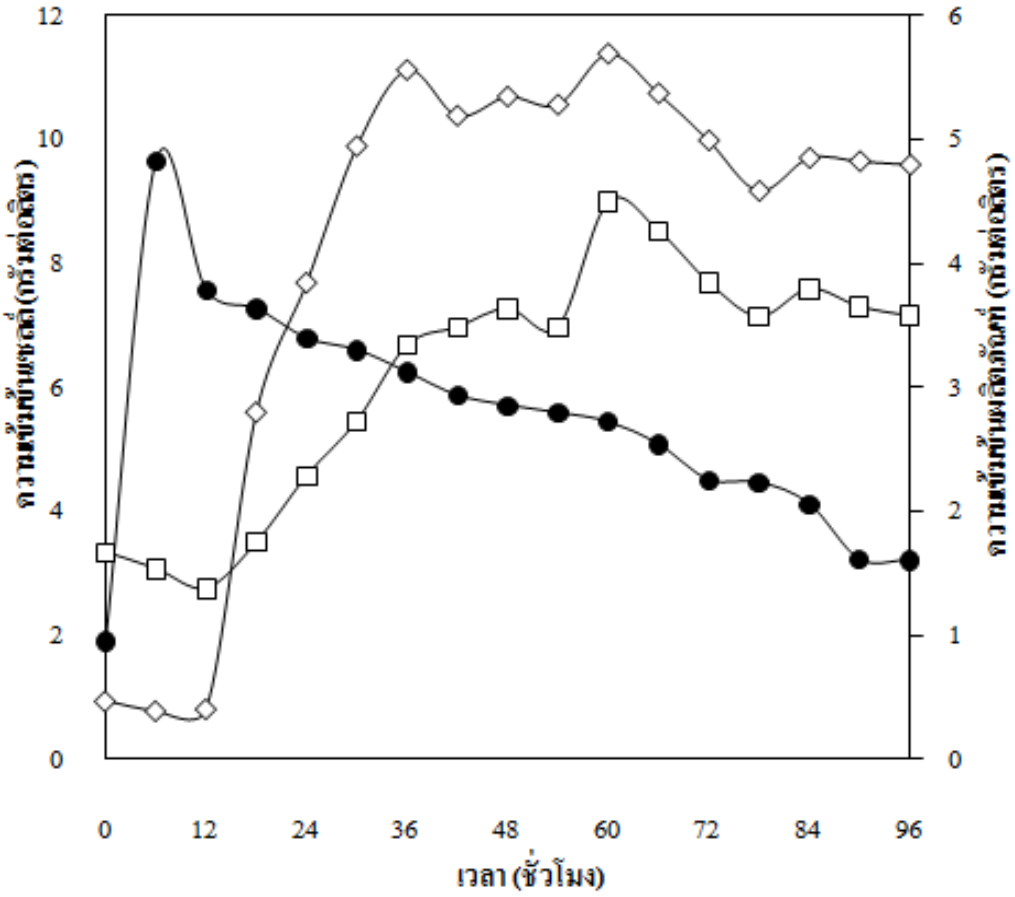


รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก

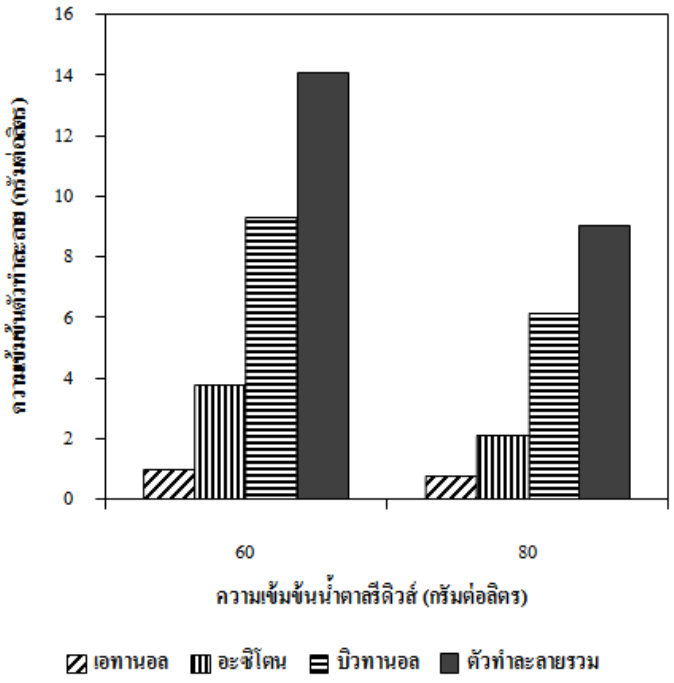


รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

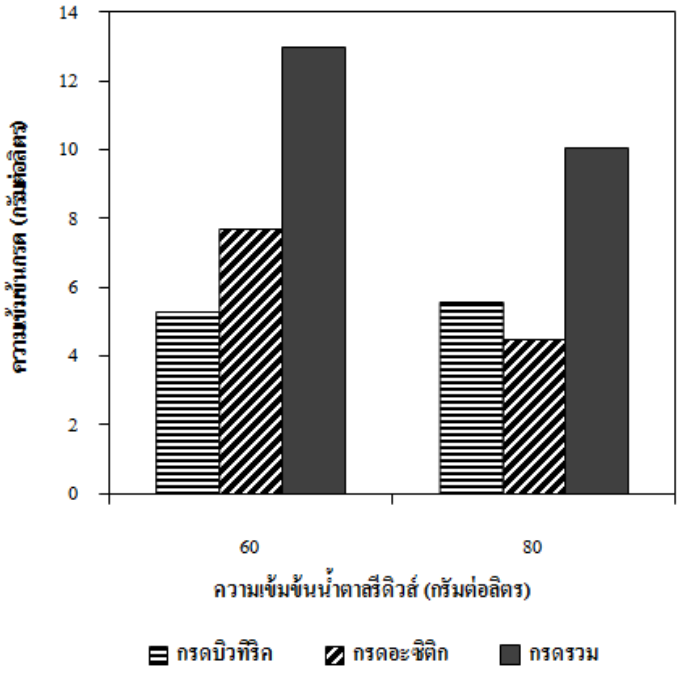


รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

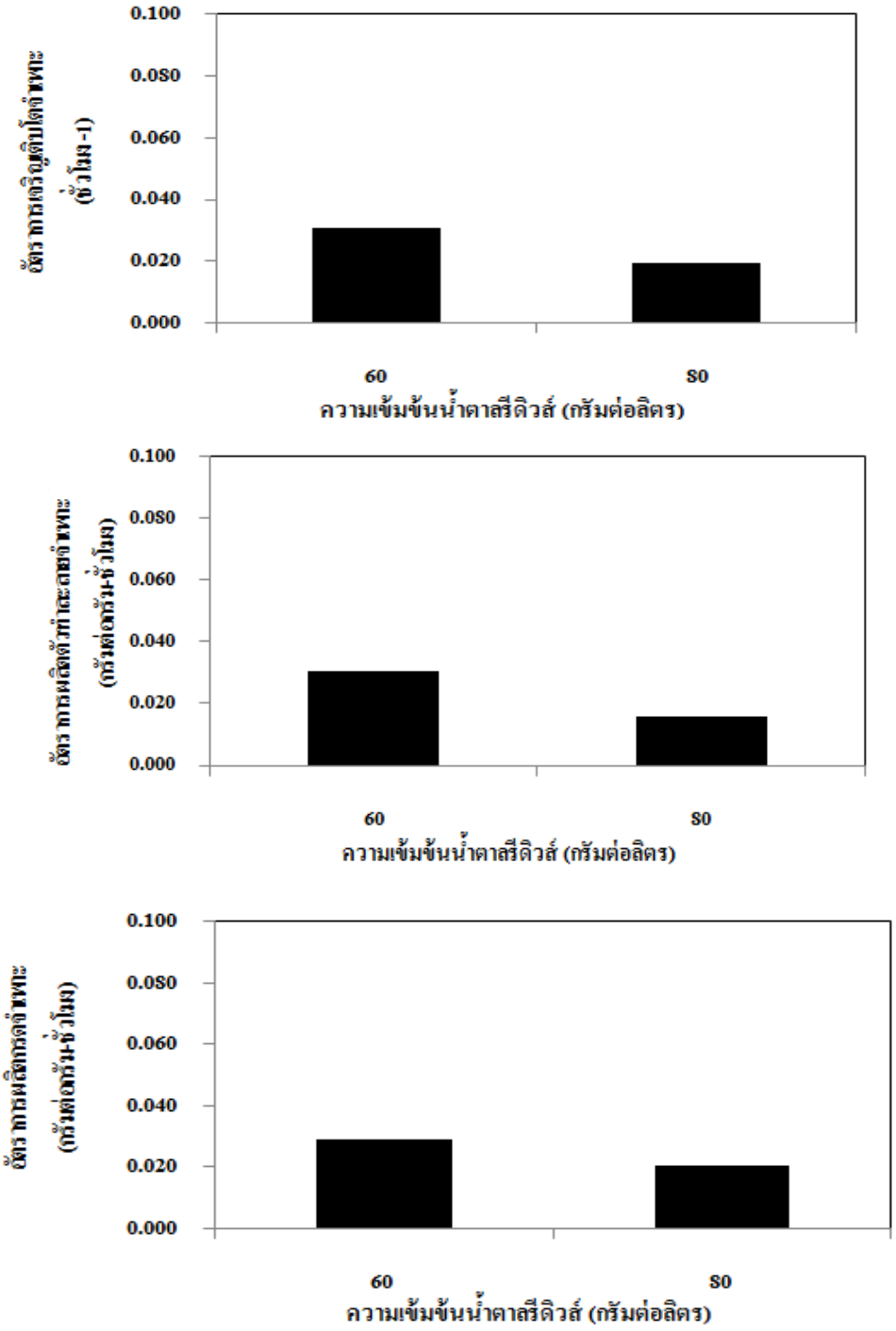
● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก



รูปที่ 4.12 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.13 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด5.0

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะโดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
	60	80
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	3.79	2.1
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	9.3	6.15
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	1	0.8
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	14.09	9.05
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	5.27	5.56
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	7.69	4.5
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	12.96	10.06
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	66.07	82.66
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	34.66	24.76
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	10.35	9.64
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	26.83	24.84
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	40.65	36.55
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	37.39	40.63
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.10	0.07
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.15	0.10
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.26	0.18
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.03	0.020
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.020	0.011
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.030	0.016
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.029	0.021

4.1.3 การผลิตบิวทานอลของเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117

การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการผลิตบิวทานอลโดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 โดยใช้สูตรอาหารที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่สภาวะไร้ออกซิเจน โดยทำการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่ม 60 และ 80 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.15-4.21

กระบวนการหมักบิวทานอลโดยศึกษาการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโต เซลล์สามารถการปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมได้อย่างดี โดยไม่มีระยะการปรับตัวการปรับตัว เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเซลล์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ถึง 58.22 กรัมต่อลิตร จากรูปที่ 4.15 และ 4.16 พบว่า การเกิดขึ้นของเซลล์ และการใช้น้ำตาลนั้นมีความสอดคล้องกัน เซลล์มีการปรับตัวต่อสภาวะสภาพแวดล้อมอยู่ในช่วง 36 ถึง 48 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เซลล์เริ่มมีการสร้างเอนไซน์มาย่อยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เนื่องจากมีการใช้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหมดในช่วงนี้ พบว่า เซลล์นั้นไม่มีการเจริญเติบโตโดยสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลนั้นมีปริมาณที่คงที่ จนกระทั่งที่เวลา 72 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตของเซลล์สูงสุด 2.91 กรัมต่อลิตร จนถึงชั่วโมงที่ 84 เซลล์สามารถผลิตบิวทานอลได้สูงสุด ร้อยละผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 29.99 จากกระบวนการการหมักแบบกะจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้สามารผลิตตัวทำละลายรวมได้ 17.46 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วยบิวทานอล 11.1 อะซิโตน 5.9 และ เอทานอล 0.46 กรัมต่อลิตร) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีน้ำตาลเหลืออยู่เพียง 3.06 กรับต่อลิตร และมีกรดอินทรีย์ บิวทิริก และอะซิติกเหลืออยู่เพียง 1.6 และ 0.21 ตามลำดับ

ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลค่อนข้างสูง จึงมีผลต่อการปรับสภาพของเซลล์ให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในระยะการปรับตัว (lag phase) ช่วง 36 ชั่วโมงแรก เพราะว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลได้ยับยังการเจริญเติบโตของเซลล์ หลังเวลาดังกล่าวปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลง จนกระทั่งเซลล์สามารปรับสภาพเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต (exponential phase) จึงเริ่มใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 138 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียง 76.47 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่งผลเซลล์มีความเข้มข้นของมวลเซลล์สูงสุดเท่าเป็น 6.59 กรัมต่อลิตร กรดบิวทิริก และอะซิติกถูกใช้ในกระบวนการผลิตตัวทำละลายอินทรีย์ ส่งผลให้ปริมาณกรดในระบบเหลือเพียง 2.66 และ 1.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับเมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วสามารถผลิตบิวทานอล อะซิโตน และ เอทานอล 11.96, 3.58 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้ปริมาณของบิวทานอลกว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ในสภาวะเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องเซลล์ใช้เวลาในการปรับสภาพค่อนข้างสูง ผลทำให้เซลล์สามารถปรับสภาพเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต (exponential phase) ได้ล่าช้า แต่ค่าของน้ำตาลทั้งสองความเข้มข้นนี้ให้ปริมาณของบิวทานอลที่ใกล้เคียงกัน ดังรูป 4.19 และ 4.20 แต่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการหมักมากว่าถึง 42 ชั่วโมง และให้ปริมาณเซลล์สูงกว่า 2.26 เท่า แต่ประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายด้อยกว่าความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาถึงค่าจลนศาสตร์ของการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น ค่า μ มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แต่อิทธิพลความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงจะมีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่นานขึ้นจาก 36 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่สภาวะการเพิ่มเซลล์แบบทวีคูณ (exponential phase) เนื่องจาการเจริญในสภาวะที่อาหารมีความเข้มข้นสูง และมีระยะเวลาที่ยาวนานกว่านี้ จึงทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด (6.59 กรัมต่อลิตร) และผลได้เซลล์ (ร้อยละ 8.62) มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการหมักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร แสดงว่า ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงมีผลเพียงชะลอการเจริญเติบโตให้เกิดขึ้นได้ช้าลงกว่าเดิม แต่ยังคงให้มวลเซลล์ที่สูงกว่า ส่วนการเจริญที่ความเข้มข้นน้ำตาลที่ต่ำ เชื้อจะมีการปรับตัวได้ดี และมี lag phase ที่สั้นมาก (รูปที่ 4.16) การเพิ่มเซลล์ และการสร้างกรดจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วมาก

ส่วนการสร้างกรดรวม พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาลสูงจะให้ค่า ν_{ac} และ Q_{ac} มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นน้ำตาลต่ำ ค่า ν_{ac} เท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง หรือ คิดเป็น 2.6 เท่า ของ ν_{ac} ที่ความเข้มข้นน้ำตาลต่ำ ส่วน Q_{ac} มีค่าใกล้เคียงกันในทั้ง 2 สภาวะ ทำให้มีความเข้มข้นของกรดรวมสูงสุด และผลได้กรดรวม ซึ่งผลิตได้มีค่าสูงกว่าสอดคล้องกับการเพิ่มมวลเซลล์

ส่วนการผลิตตัวทำละลายรวมนั้น พบว่า ที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร เซลล์มีสามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยค่า ν_{sol} (0.158 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง) และ Q_{sol} (0.174 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง) ที่สูงกว่า เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นตัวทำละลายรวมสูงสุด (17.46 กรัมต่อลิตร) และผลได้ตัวทำละลายรวม (ร้อยละ 29.99) จากตารางที่ 4.3 พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากที่สภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้แล้ว เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักความเข้มข้นของกรดที่เหลืออยู่ในระบบจะเหลืออยู่เป็น 1.83 กรัมต่อ

ลิตร จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการสร้างตัวทำละลายและการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้

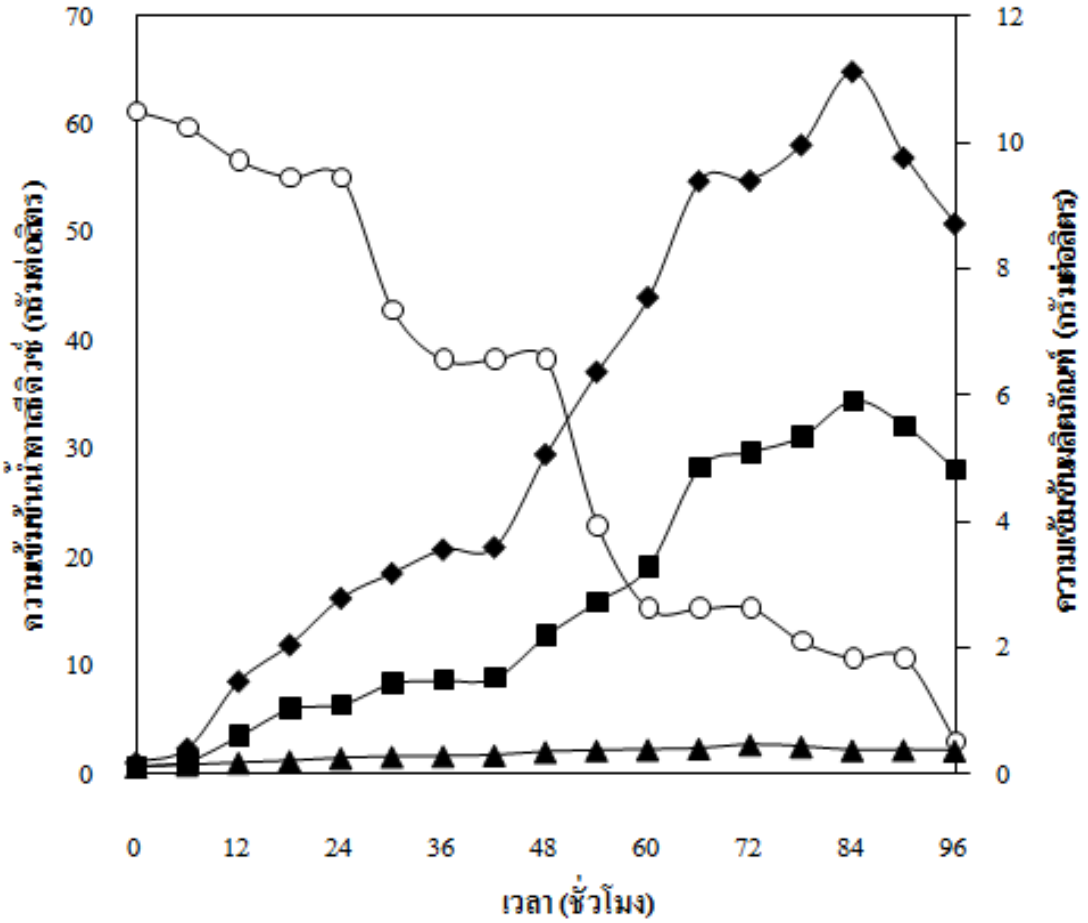
ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 คือ 60 กรัมต่อลิตร โดยจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสร้างมวลเซลล์ที่ดีกว่า รวมทั้งสร้างตัวทำละลายรวมได้ในปริมาณสูงกว่า และใช้เวลาการสร้างผลิตภัณฑ์ที่น้อยกว่า ถึงแม้ว่า การหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลทั้ง 2 สภาวะ จะให้ปริมาณบิวทานอลที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะที่สุดของเชื้อคลอสตริเดียมทั้งสามสายพันธุ์มาทำการเปรียบเทียบปริมาณของตัวทำละลายรวม และปริมาณของบิวทานอล ถ้าพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่ใช้ พบว่า เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 และ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ใช้น้ำตาลได้น้อยกว่า แต่ ให้ปริมาณของบิวทานอลได้สูงกว่า *C. acetobutylicum* ATCC 824 ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้เชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 เพราะว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 สามารถให้ปริมาณของบิวทานอล และตัวทำละลายรวมสูง ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร สูตรอาหารที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่สภาวะไร้ออกซิเจน มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตตัวทำละลายต่อไป

จากรูปที่ 4.22 จะเห็นได้ว่า *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 เมื่อเปรียบเทียบ ν_{sol} นั้น เชื้อสายพันธุ์นี้มี ν_{sol} จำเพาะสูงสุด หรือคิดเป็น 6.6 และ 5.2 เท่าของสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 และ คลอสตริเดียมสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ตามลำดับ แสดงว่ามีประสิทธิภาพของมวลเซลล์ในการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายได้ดีมากที่สุด

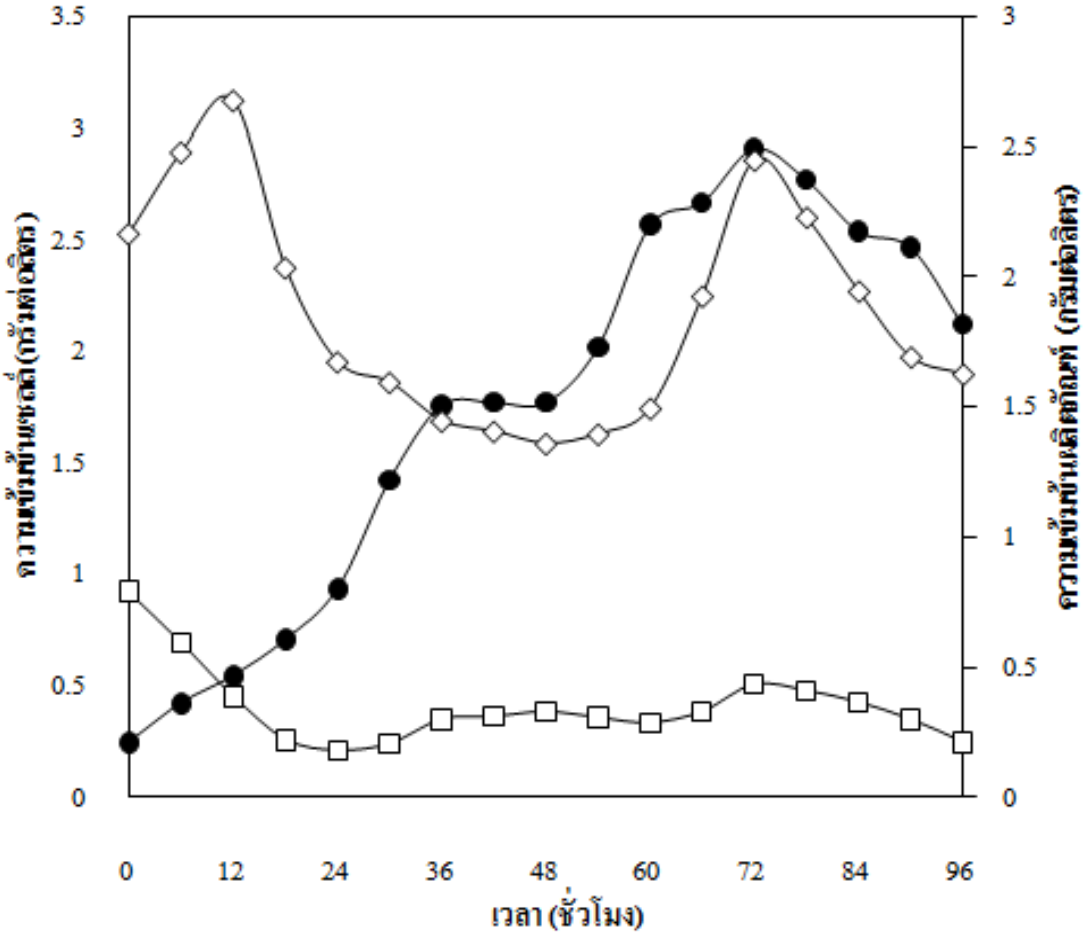
กระบวนการหมักของเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 มีค่าจลนศาสตร์ของการหมักสูงที่สุด ส่วนสายพันธุ์ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 จะมีค่าต่ำที่สุด แม้ว่าสามารถผลิตมวลเซลล์ที่สูงก็ตาม แต่ผลจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์กรดต่อเซลล์ทำให้ทำให้ประสิทธิภาพของเซลล์ในการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายได้น้อย

ดังนั้นกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อยโดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 จึงมีความเหมาะสมที่สุด การทดลองในปัจจัยอื่นๆ จึงเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ในการทดลองต่อไป



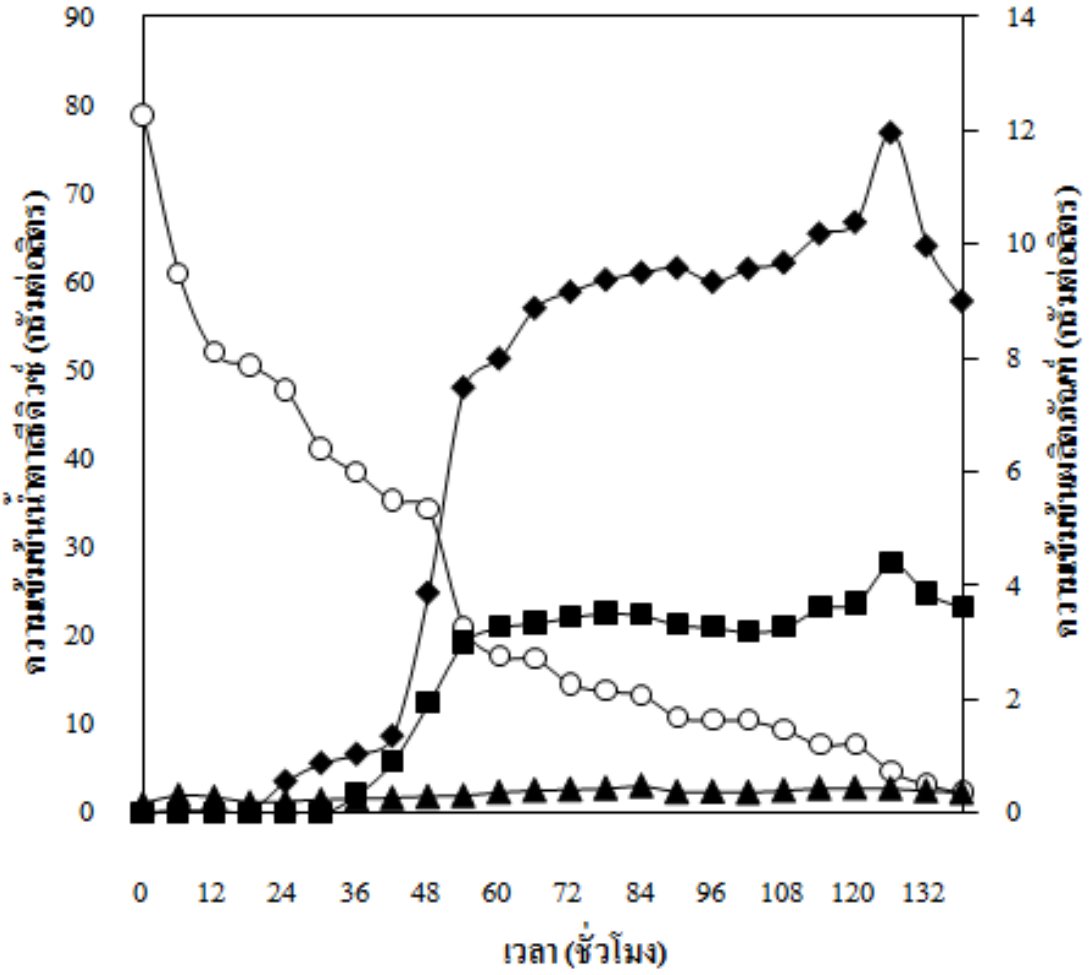
รูปที่ 4.15 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล



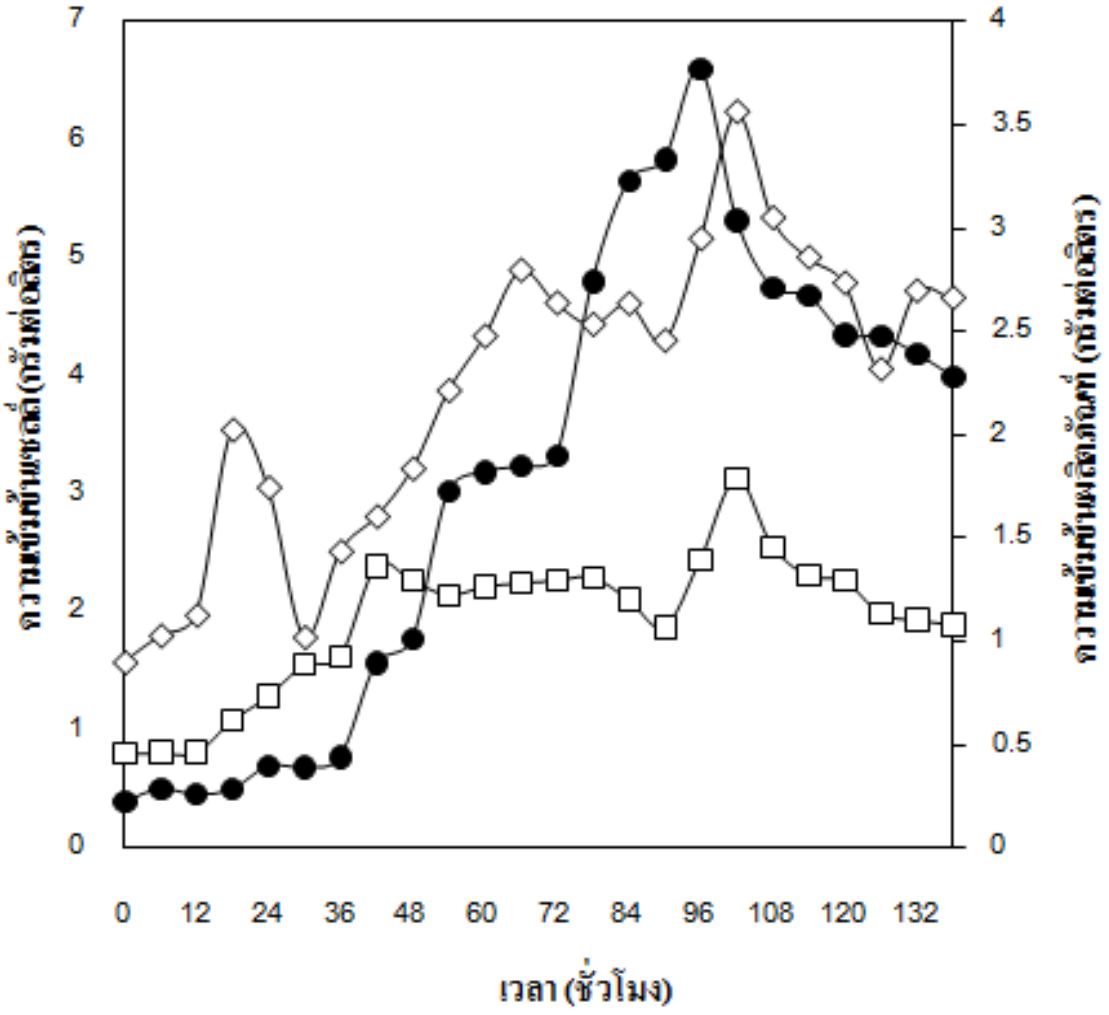
รูปที่ 4.16 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก



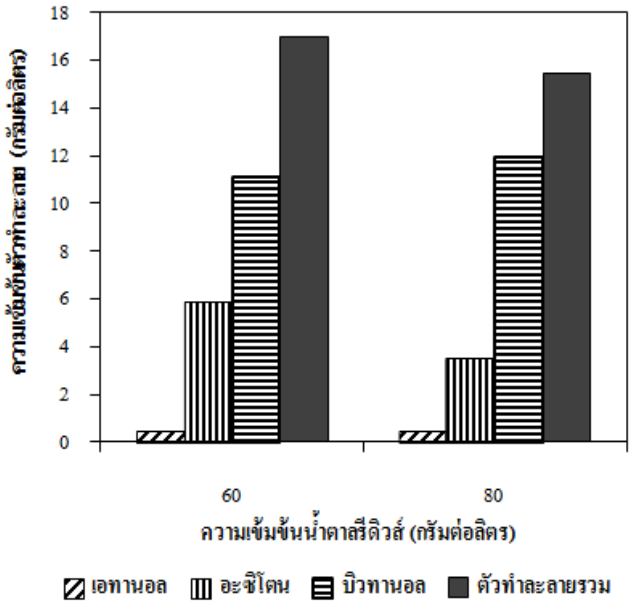
รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

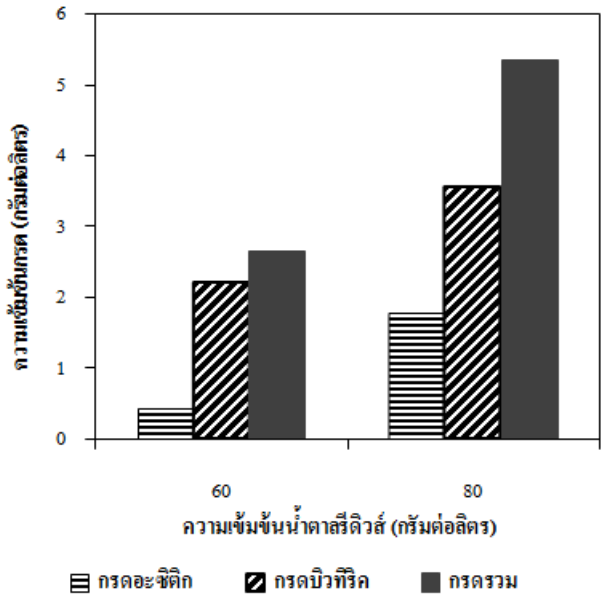


รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

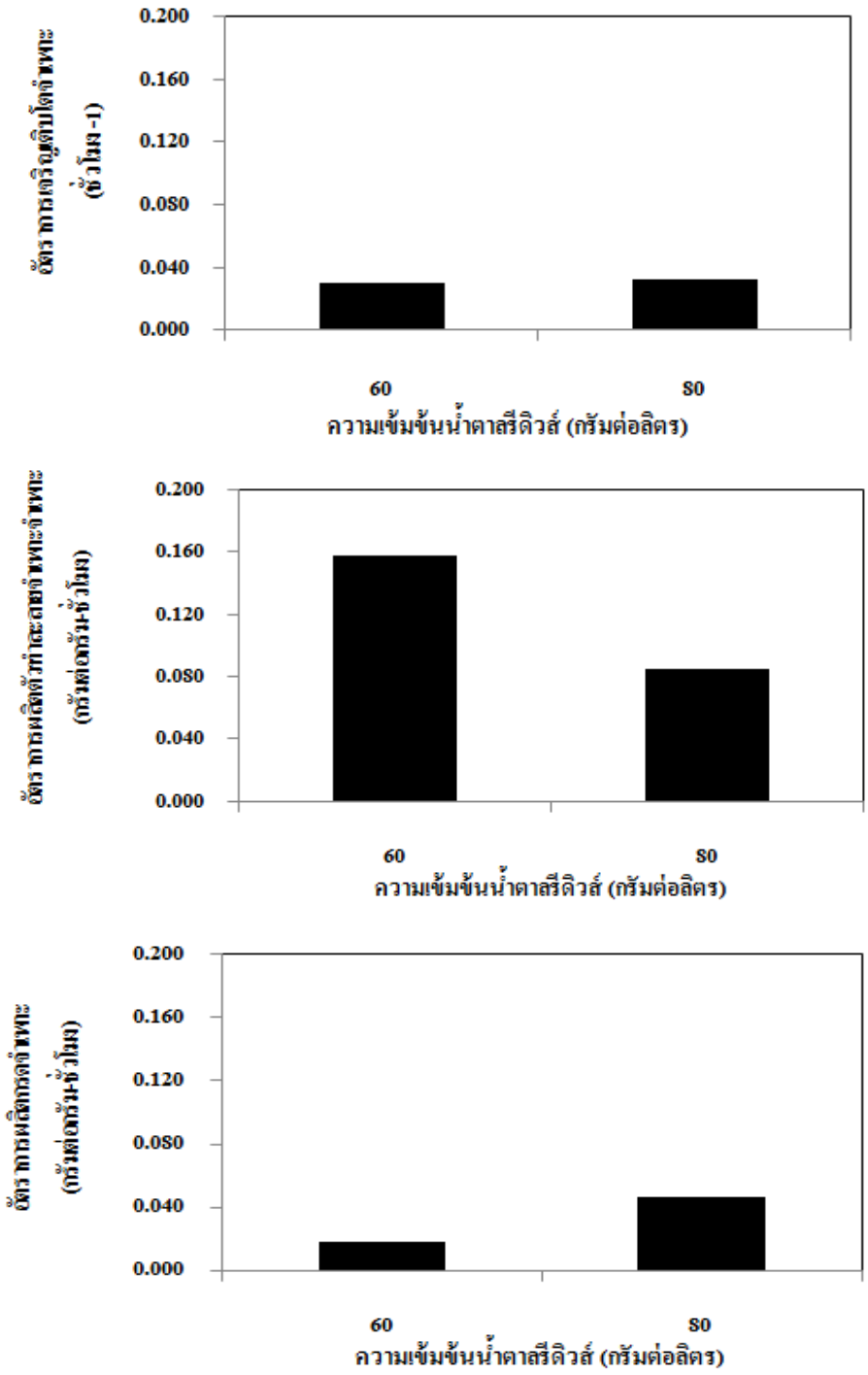
● เซลล์ ◇ กรดบิวทีริก □ กรดอะซิติก



รูปที่ 4.19 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



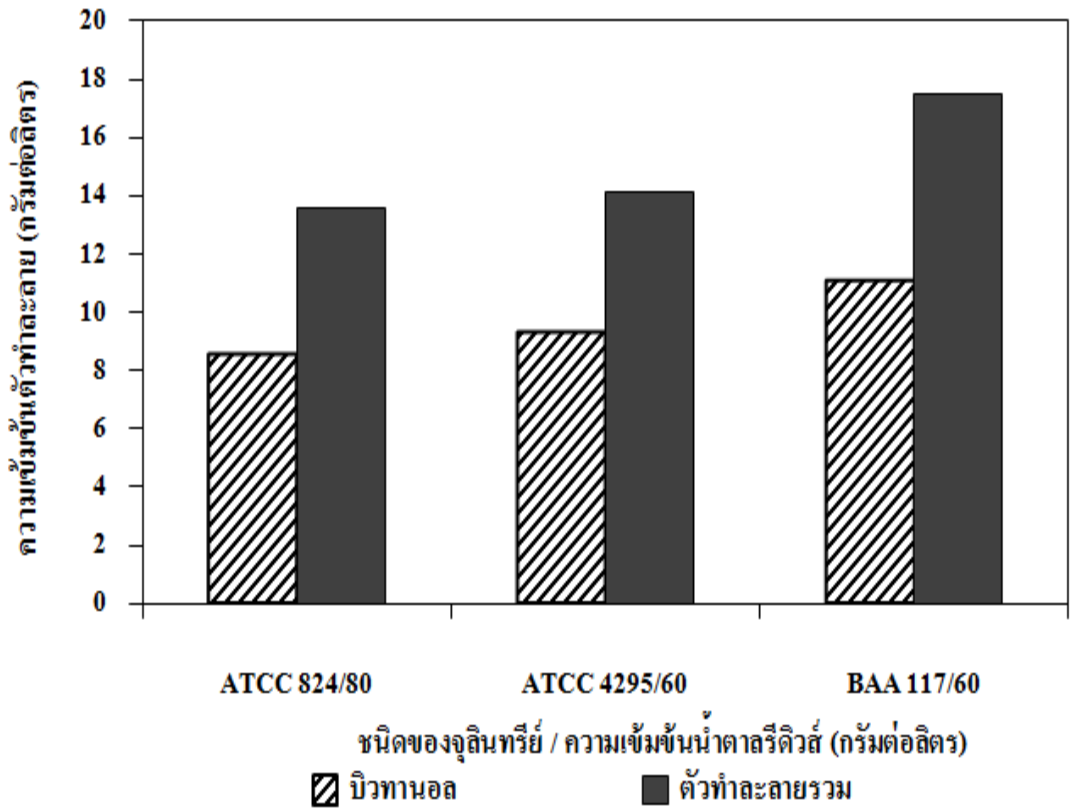
รูปที่ 4.20 ผลความเข้มข้นของน้ำอ้อยต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.21 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด5.0

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 ในกระบวนการหมักแบบกะโดย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	
	60	80
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	5.9	3.52
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	11.1	11.96
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.46	0.48
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	17.46	15.96
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	2.23	3.56
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	0.43	1.78
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	2.66	5.34
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	61.28	78.84
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	58.22	76.47
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	2.91	6.59
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	138
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	19.07	15.64
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	29.99	20.87
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	4.57	6.98
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.112	0.077
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.174	0.114
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.059	0.068
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.03	0.033
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.104	0.056
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.158	0.085
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.018	0.047



รูปที่ 4.22 การเปรียบเทียบปริมาณบิวทานอล และตัวทำละลายรวมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดต่อความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด 5.0

4.2 ศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตบิวทานอล จากเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ

4.2.1 การใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดเดียว

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มากกว่าอนินทรีย์ (สมใจ ศิริโภค, 2012) งานวิจัยนี้เลือกใช้สูตรอาหารที่ 1 (อังคณา สุจริต, 2010) โดยสูตรอาหารนี้มีส่วนประกอบของแหล่งไนโตรเจนรูปอินทรีย์ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 0.22 และทริปโทน 0.70 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ประกอบด้วย แอมโมเนียมอะซิเตต 0.54 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในสูตรอาหารนี้มีปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด 1.46 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยเลือกใช้ ยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผงชูรส มีปริมาณไนโตรเจน 10.97 7.5 และ5.01 กรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมสารทั้งหมด แล้วนำแหล่งไนโตรเจนทั้งสามชนิดนี้มาทดแทนปริมาณไนโตรเจน ในสูตรอาหารที่ 1 ทั้งหมด โดยใช้ปริมาณ ยีสต์สกัด, แอลไลซีน และกากผงชูรส 13.18, 19.57 และ 29.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับโดยเท่ากับปริมาณของยีสต์สกัด และทริปโทนสูตรอาหารที่ 1 ทั้งหมด จากผลการศึกษาในหัวข้อ 4.1 พบว่า โดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 มีความเหมาะสมมากที่สุดในการผลิตผลิตภัณฑ์ เพราะว่าสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นต่ำ 60 กรัมต่อลิตร แล้วสามารถผลิตบิวทานอลได้ในปริมาณที่สูง ในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในกระบวนการหมักแบบกะ

ผลจากรูปที่ 4.24 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวโดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 จากรูปที่ 4.23 ในระยะเริ่มต้นเซลล์ไม่มีระยะการปรับตัว (lag Phase) แสดงว่า เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต (exponential phase) ในช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมง ระยะนี้เซลล์สามารถใช้น้ำตาลในการเพิ่มมวลเซลล์สูงสุดเป็น 3.92 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันก็ผลิตกรดอินทรีย์ (บิวทิริก 4.50 และอะซิติก 3.22 กรัมต่อลิตร)ร่วมกัน ชั่วโมงที่ 48-96 กรดถูกใช้ผลิตตัวทำละลาย ผลคือ มีตัวทำละลายเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (บิวทานอล 10.67 อะซิโตน 4.93 และเอทานอล 0.46 กรัมต่อลิตร) จนกระทั่งชั่วโมงที่ 90 เซลล์สามารถใช้น้ำตาลได้หมด จนสุดท้ายมีปริมาณของ บิวทิริก, อะซิติกเหลือเพียง 2.45 และ 1.93 ตามลำดับ

ผลการศึกษาการใช้แอลไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ดังรูปที่ 4.25-4.26 เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์สามารถใช้น้ำตาลเหลือเพียง 9.24 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการ

หมัก เซลล์มีการปรับสภาพให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในระยะการปรับตัว (lag phase) ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโต (exponential phase) ช่วงนี้สามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด 1.94 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดอินทรีย์เริ่มผลิตที่ชั่วโมงที่ 18 โดยสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็ว มีปริมาณกรดรวมสูงถึง 11.54 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย บิวทิริก และอะซิติก 5.53, 6.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าการใช้ แอลไลซีนมีผลต่อการผลิตกรดโดยตรง โดยจุลินทรีย์สามารถใช้กรดเพื่อตัวทำละลาย (บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล 7.27 3.63 และ 0.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)

ผลการศึกษาการใช้กากผลชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่มีระยะการปรับตัว สามารถใช้น้ำตาลสูงถึง 40.84 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 5.31 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูป 4.27 และ 4.28 ชั่วโมงที่ 12 เซลล์เริ่มมีการผลิตกรดสูงถึง 10.40 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วย บิวทิริก อะซิติก 4.51 และ 5.89 กรัมต่อลิตร) จุลินทรีย์สามารถใช้กรด ชั่วโมงที่ 36 ส่งผลให้ปริมาณของตัวทำละลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และได้ปริมาณมากสุดที่ชั่วโมงที่ 72 บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล 5.26, 1.20 และ0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เปรียบเทียบผลของการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผลชูรส ปรากฏว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้สูงสุด รองลงมาคือแอลไลซีน และกากผลชูรสนั้นมีปริมาณน้ำตาลเหลือมากที่สุด เพราะว่า ยีสต์สกัดอุดมไปด้วย วิตามินแร่ธาตุ และกรดอะมิโนหลายชนิด (SN WALFORD, 1996) สอดคล้องกับกับผลิตตัวทำละลายรวม โดยยีสต์สกัดให้ปริมาณตัวทำละลายรวม และบิวทานอลสูงสุด จากรูปที่ 4.30 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดอินทรีย์ พบว่า แอลไลซีน สามารถผลิตกรดรวมได้มากที่สุด รองลงมาคือ กากผงชูรสและยีสต์สกัดตามลำดับ แสดงว่าทั้งกากผลชูรส และแอลไลซีนมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เหมาะสมในสภาวะการผลิตกรดมากกว่าการผลิตตัวทำละลาย ส่วนยีสต์สกัดมีปริมาณสารอินทรีย์ที่เอื้อต่อสภาวะการผลิตตัวทำละลายที่สูงกว่า แหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิด

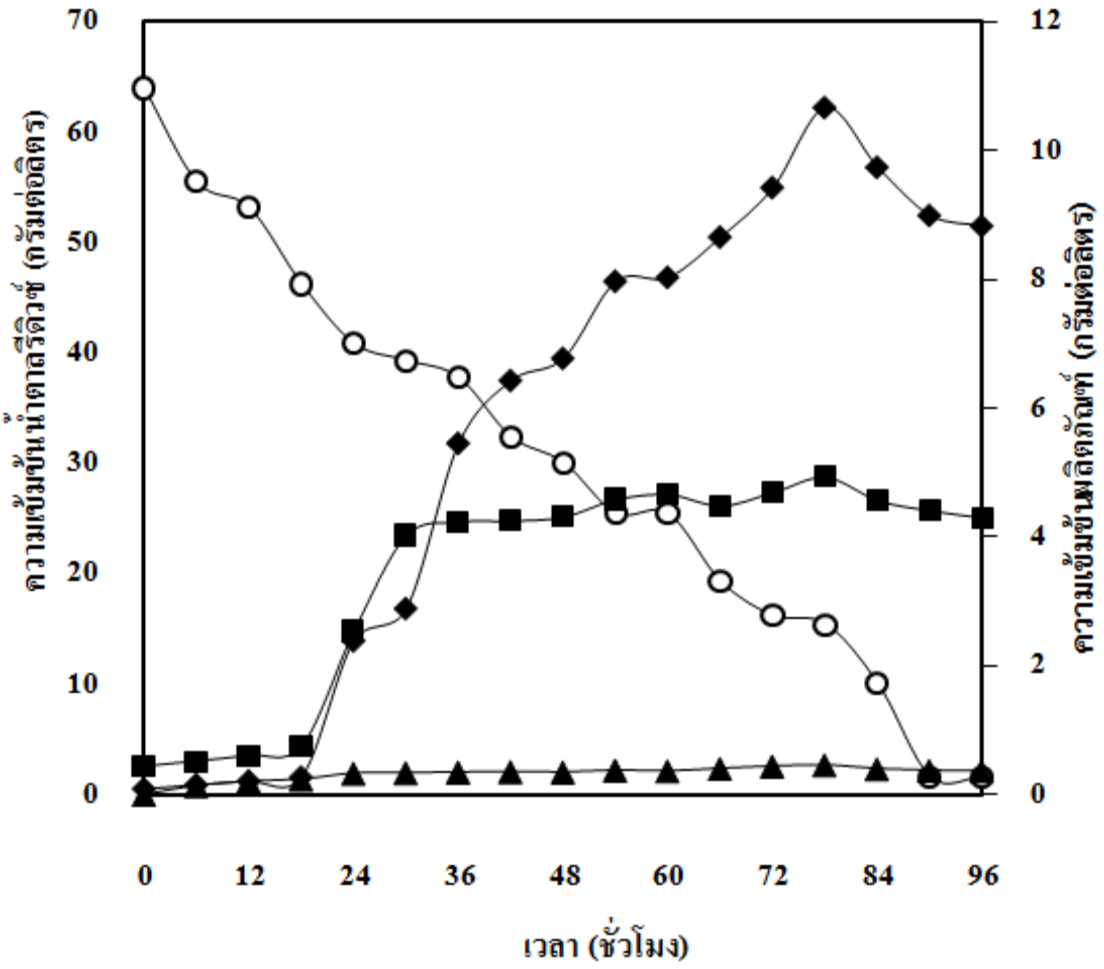
เมื่อพิจารณาถึงค่าจลนศาสตร์ของการหมักเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เป็นยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผงชูรส พบว่า กากผงชูรสมีผลต่อการส่งเสริมการเพิ่มมวลเซลล์มากที่สุด โดยให้อัตราการเจริญ เติบโตจำเพาะ μ สูงสุดถึง 0.027 ชั่วโมง$^{-1}$ รองลงมา คือ การใช้ยีสต์สกัด (0.021ชั่วโมง$^{-1}$) และแอลไลซีน (0.014ชั่วโมง$^{-1}$) ซึ่งสอดคล้องกับผลของความเข้มข้นของเซลล์ และผลได้เซลล์ที่ได้จากตารางที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนมีส่วนในการช่วย

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงว่าในกากผงชูรส มีสารบางชนิดที่ช่วยในการส่งเสริมการเพิ่มมวลเซลล์

ส่วนการสร้างกรดรวมของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า แอลไลซีนมีส่วนในการช่วยส่งเสริมการสร้างกรดรวมได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอีกสองชนิด โดยจะให้ค่า ν_{ac} (0.236 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง) สูงสุด แม้ว่าจะมีการผลิตมวลเซลล์ที่น้อยก็ตาม แต่ Q_{ac} (0.210 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง) มีค่าสูงสุด รวมทั้งความเข้มข้นกรดสูงสุด (11.54 กรัมต่อลิตร) และผลได้กรดรวม (ร้อยละ 22.35) มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้การใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน

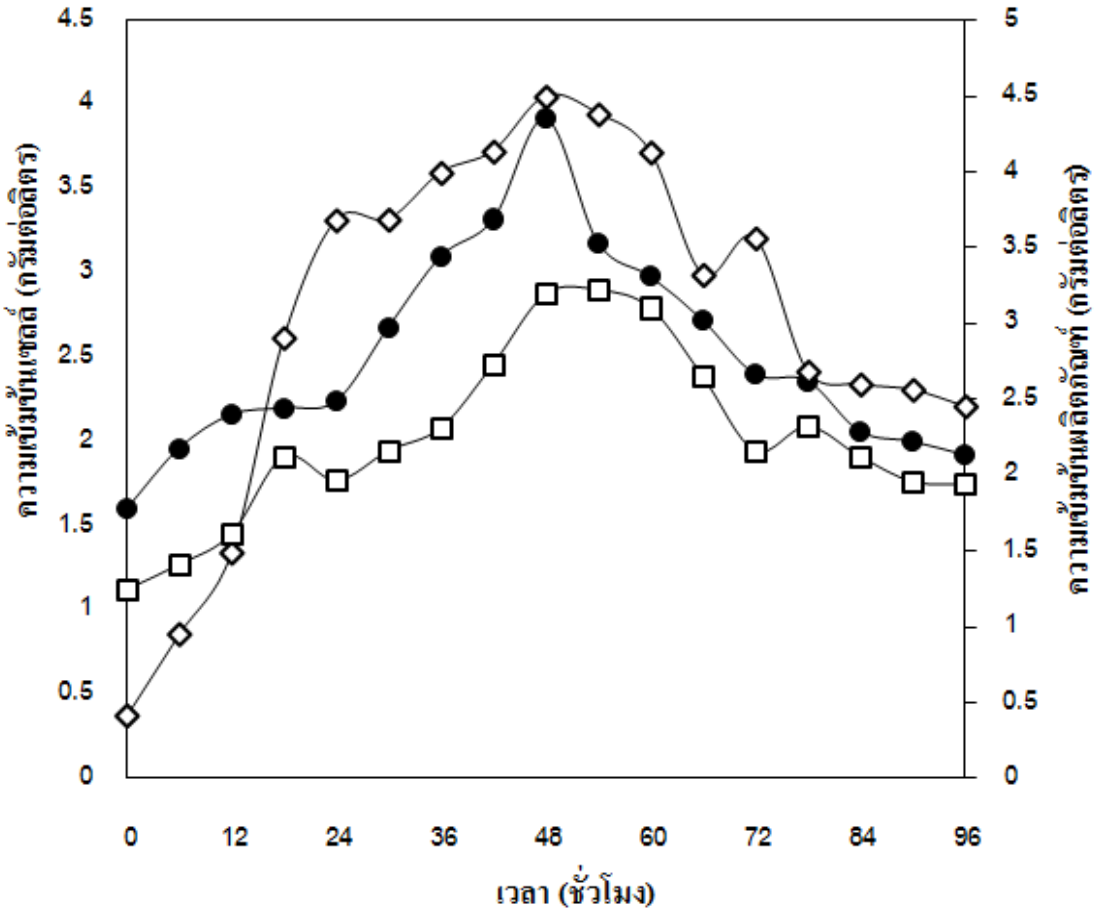
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของเซลล์ในการผลิตตัวทำละลายรวม พบว่า ยีสต์สกัดมีส่วนในการช่วยส่งเสริมการสร้างตัวทำละลายรวมได้ดีที่สุด โดยมีค่า Q_{sol} สูงถึง 0.192 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง จะสอดคล้องกับปริมาณตัวทำละลายรวม (16.06 กรัมต่อลิตร) และค่าผลได้ตัวทำละลายรวม (ร้อยละ 25.73) จัดว่าเป็นค่าที่ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้แอลไลซีน และกากผงชูรส แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า ν_{sol} ปรากฏว่า การใช้แอลไลซีนเป็นแหล่งในโตรเจนมีค่า ν_{sol} สูงสุด (0.186 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง) แสดงว่า มวลเซลล์มีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายมากถึงแม้ว่า จะมีมวลเซลล์ที่น้อยสุดก็ตาม จากผลที่ได้ สรุปว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการส่งเสริมการผลิตตัวทำละลาย

ดังนั้นการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเหมาะสมมากที่สุดเพราะทำให้จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพของในใช้น้ำตาลได้ดี และผลิตตัวทำละลายได้สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้งสองชนิด เพราะว่ายีสต์สกัดอุดมไปด้วย กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุช่วยส่งเสริมในกระบวนการผลิตตัวทำละลาย และยังเป็นแหล่งไนโตรเจนรูปอินทรีย์ มีอะตอมไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ช่วยเสริมสร้างโครงสร้างของเซลล์ได้โดยตรง รวมทั้งกระบวนการสันดาปต่างๆของเซลล์และที่สำคัญยังเป็นองค์ประกอบหลังของดีเอนเอ และอาร์เอ็นเอ มีผลต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์ (สมใจ ศิริโภค, 2555)



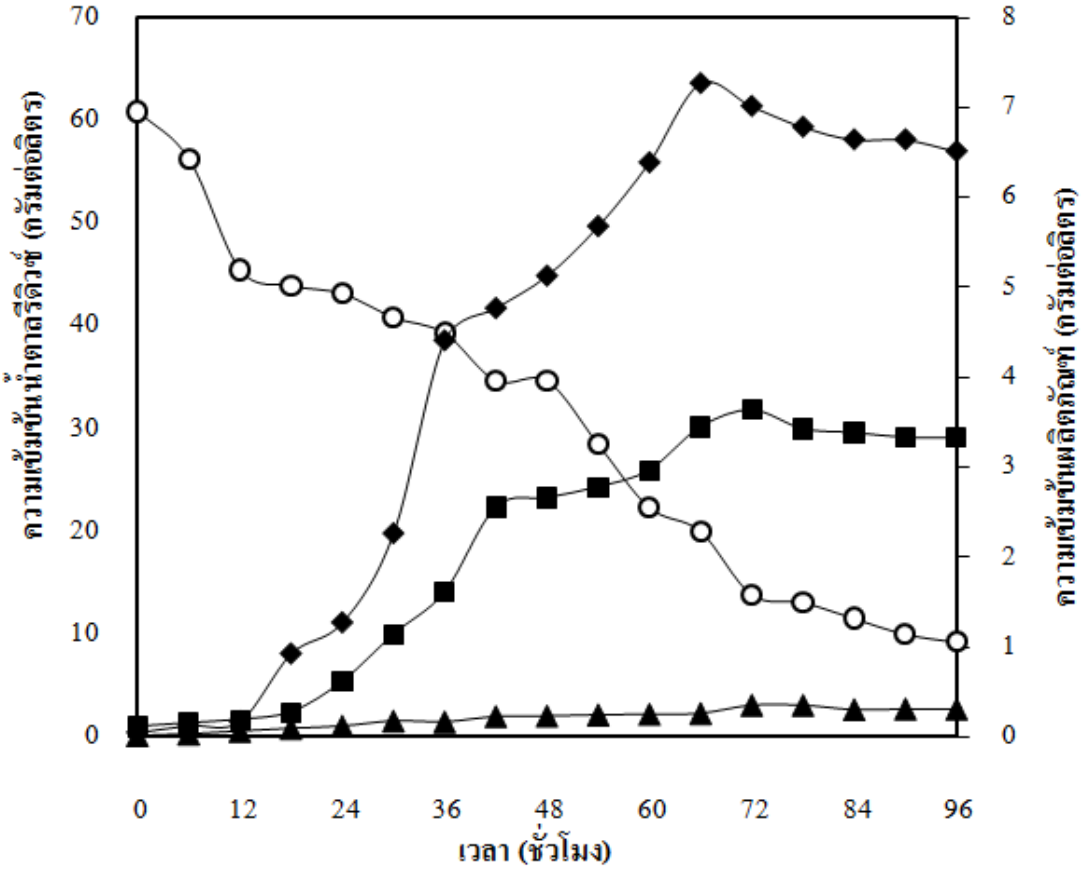
รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล



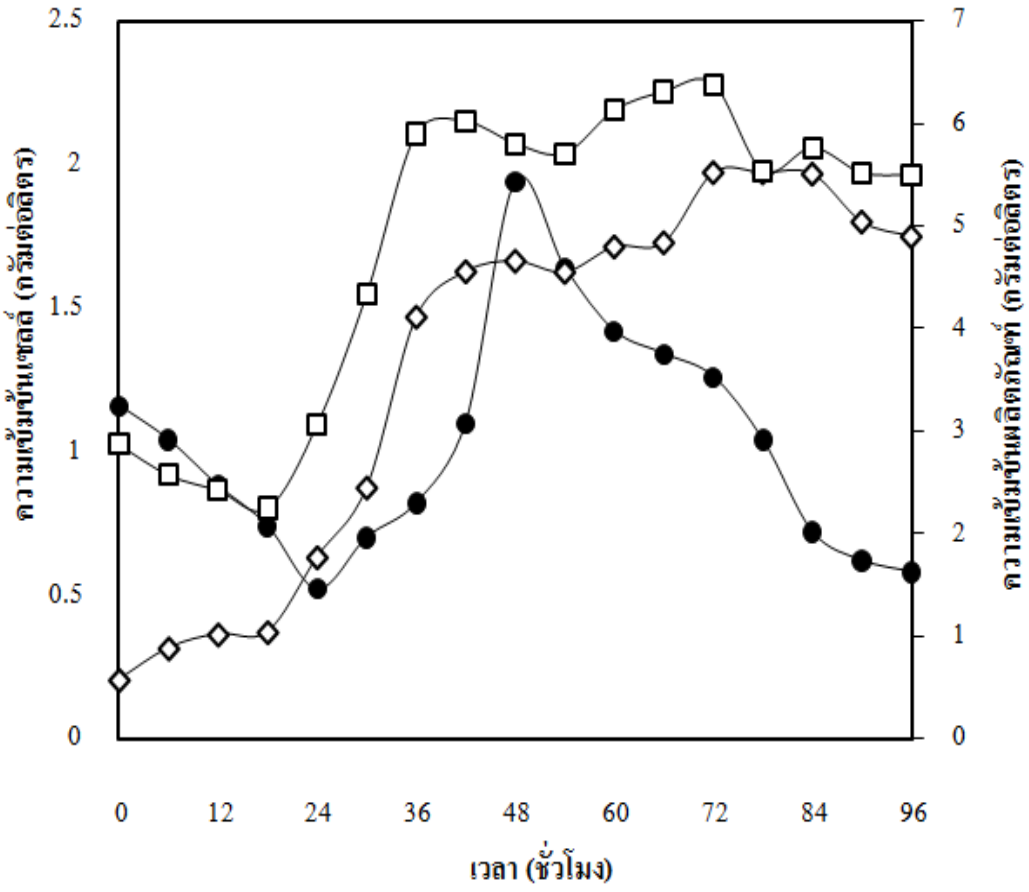
รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยโดยใช้ยีสต์สกัด เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

● เซลล์ ◇ กรดบิวทีริก □ กรดอะซิติก



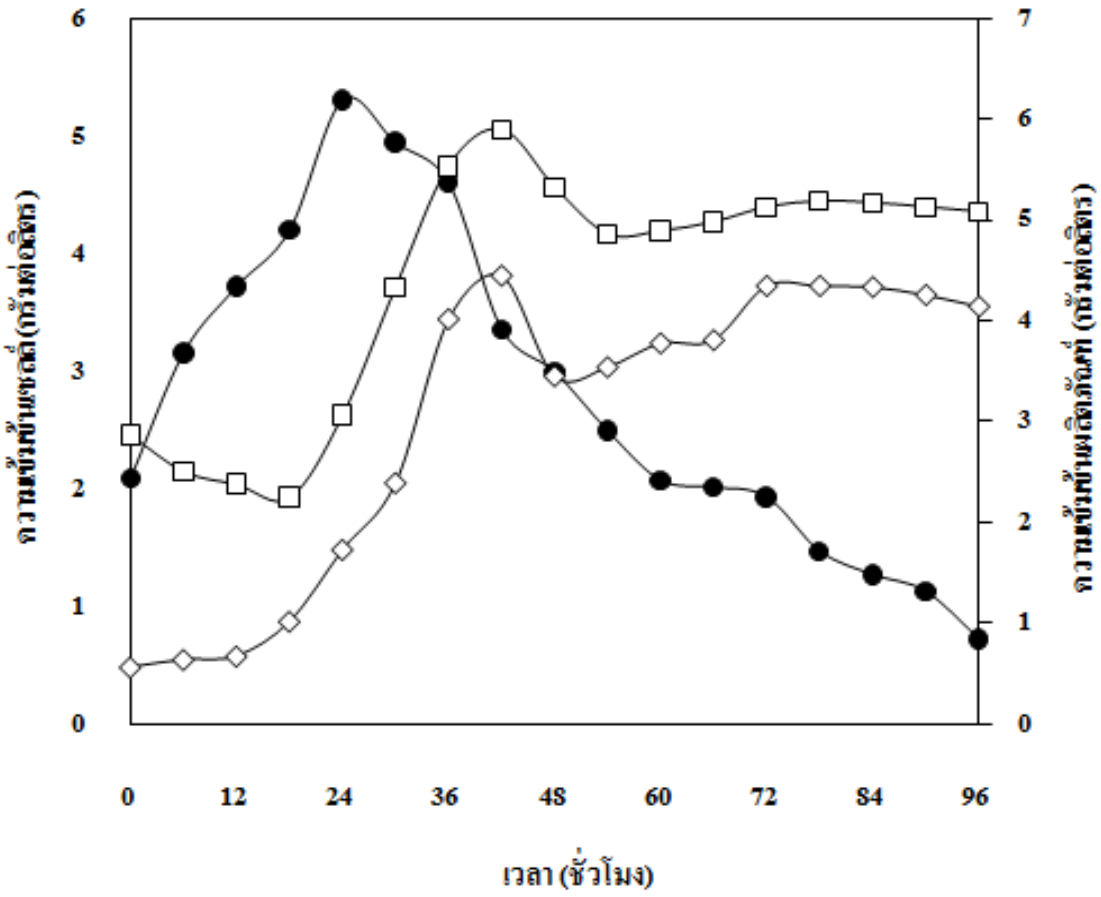
รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล



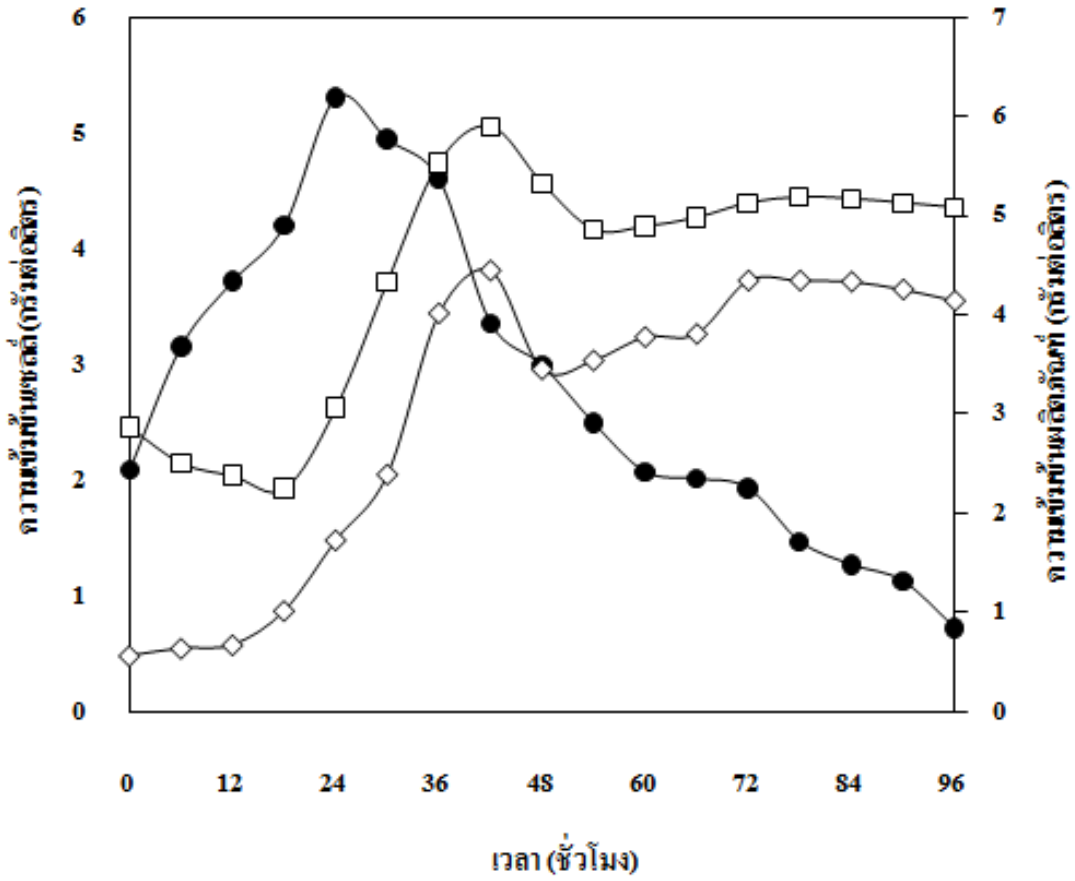
รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก

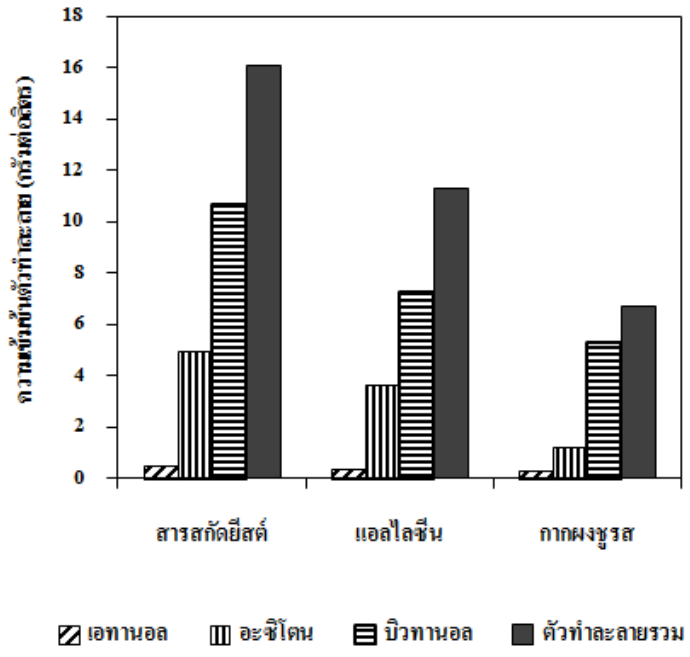


รูปที่ 4.27 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย น้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

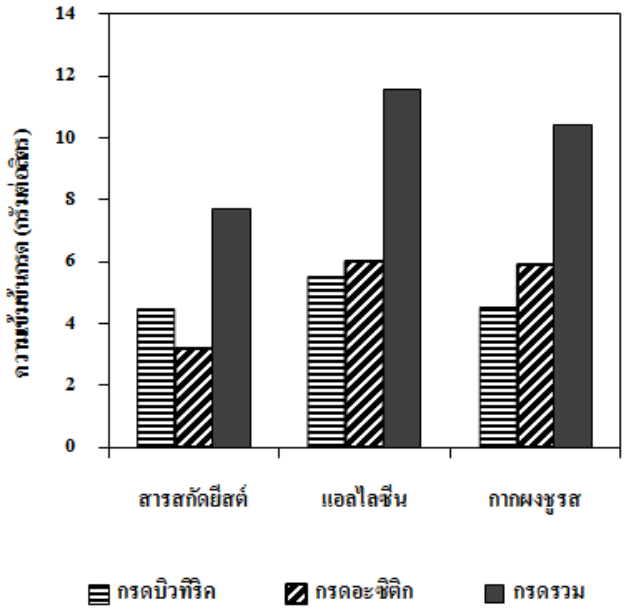
○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล



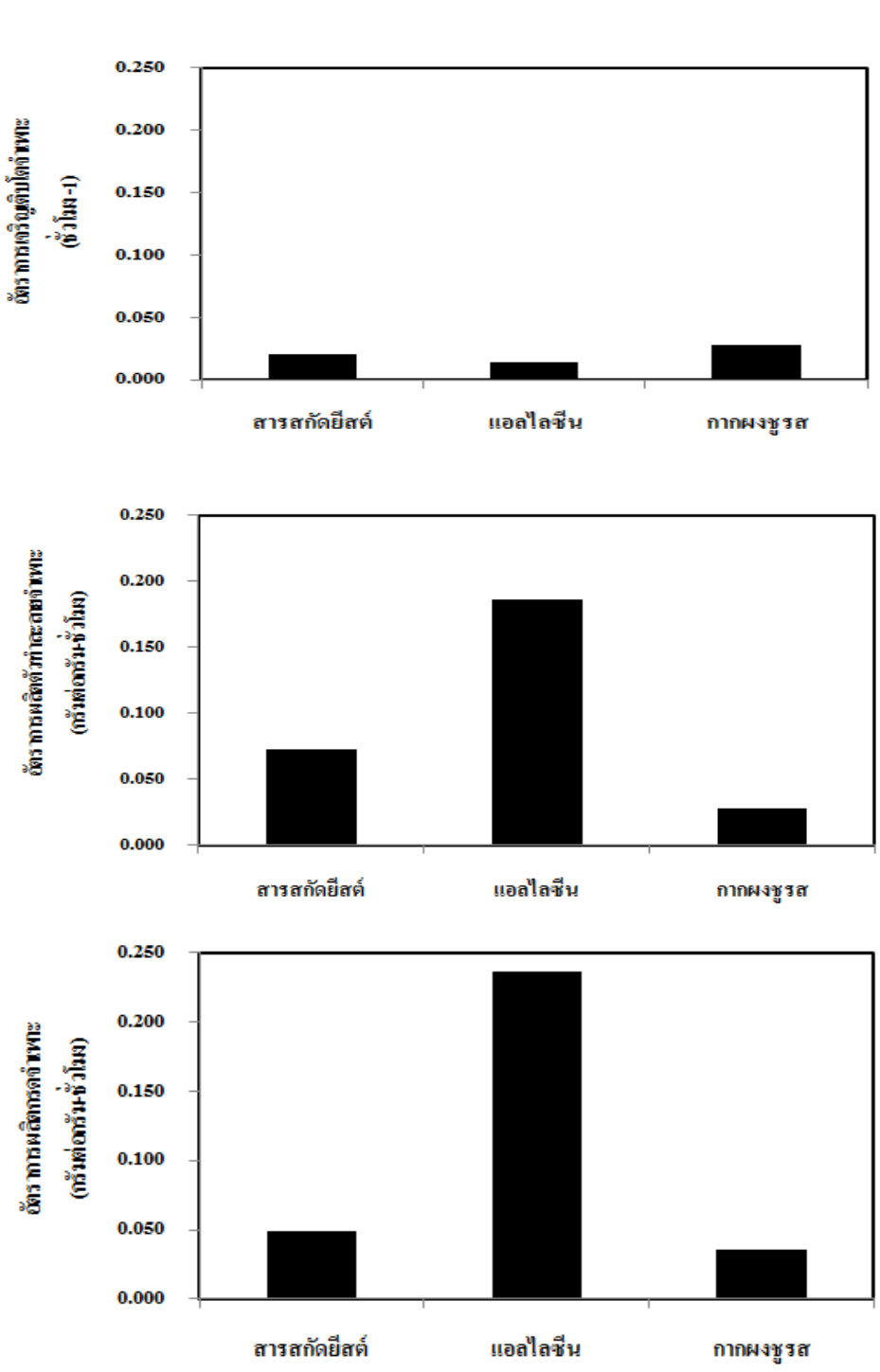
รูปที่ 4.28 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยโดยใช้กากผงชูรส เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.29 ผลของชนิดแหล่งไนโตเจนต่อการผลิตตัวทำละลาย โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.30 ผลของชนิดแหล่งไนโตเจนต่อการผลิตกรด โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.31 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด 5.0

ตารางที่ 4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวต่อการผลิตตัวทำละลายและกรด ในกระบวนการหมักแบบกะโดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน		
	สารสกัดยีสต์	แอลไลซีน	กากผงชูรส
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	4.93	3.63	1.2
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	10.67	7.27	5.26
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.46	0.35	0.25
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	16.06	11.25	6.71
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	4.5	5.53	4.51
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	3.22	6.01	5.89
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	7.72	11.54	10.4
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	63.95	60.87	61.64
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	62.41	51.63	40.84
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	3.92	1.94	5.31
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	17.10	14.08	12.88
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	25.73	21.79	16.43
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	12.37	22.35	25.47
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.106	0.080	0.056
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.192	0.125	0.072
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.157	0.214	0.193
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.021	0.014	0.027
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.048	0.122	0.022
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.073	0.186	0.027
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.049	0.236	0.036

4.2.2 การใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์

การใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีผลโดยตรงกับการผลิตตัวทำละลายมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว จากสูตรอาหารที่ 1 ใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว คือ แอมโมเนียมอะซิเตต 3 กรัมต่อลิตร แล้วแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ปริมาณ 0.92 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ด้วย ยีสต์สกัด แอลไลซีน และ กากผลชูรส 8.41, 12.30 และ 18.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษายีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต ดังรูปที่ 4.32-4.33 พบว่า เซลล์สามารถใช้น้ำตาลเหลือเพียง 1.37 กรัมต่อลิตร เซลล์อยู่ในระยะการปรับตัว (lag phase) จนถึง48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์เข้าสู่สภาวะการเจริญเติบโต (exponential phase) จนมีมวลเซลล์สูงสุด 3.01 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 36 จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล 15.83 5.08 และ 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่งผลให้มีปริมาณ บิวทาริก และอะซิติก เหลือเพียง 1.14 และ 1.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษาแอลไลซีนร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต ดังรูปที่ 4.34-4.35 จุลินทรีย์มีการเปลี่ยนจากระยะการปรับตัว (lag phase) เป็นระยะการเจริญเติบโตที่ชั่วโมงที่ 42 สามารถให้ปริมาณเซลล์ที่สูงที่สุดเท่ากับ 4.76 กรัมต่อลิตร และเซลล์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 55.48 กรัมต่อลิตรเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เซลล์สามารถผลิตกรดบิวทิริก และอะซิติก 4.22, 2.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชั่วโมงที่ 24 จุลินทรีย์มีการใช้กรดเปลี่ยนตัวทำละลายมีปริมาณที่เพิ่มขึ้น บิวทานอล เอทานอล อะซิโตน 8.71, 3.35 และ 0.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษากากผงชูรสร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต ดังรูป 4.36-4.37 ระยะ 42 ชั่วโมงแรก จุลินทรีย์อยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) ผนวกปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้เริ่มลดลงอย่างช้าๆ เชื้อสามารถผลิตเซลล์สูงสุดเป็น 1.49 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เพียง 26.8 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถผลิตกรดบิวทิริก และอะซิติกได้ 4.09 และ 3.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในกระบวนการผลิตตัวทำละลาย จุลินทรีย์สามารถใช้กรด จนได้ปริมาณตัวทำละลาย บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล 5.31, 0.3 และ 7.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เปรียบเทียบผลการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีร่วมกับอนินทรีย์ พบว่า การใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตให้ปริมาณตัวทำลายรวม และบิวทานอลสูงสุด 21.51 และ15.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากที่สุด แต่ให้ปริมาณกรดรวมน้อยที่สุด ดังรูป 4.38-4.39 พบว่า แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ทั้งแอลไลซีน และกากผงชูรสจะมีส่วนส่งเสริมกระบวนการผลิตกรดได้ดี กว่ายีสต์สกัด แต่เนื่องจากยีสต์สกัดอุดมไปด้วย

วิตามินแร่ธาตุ และกรดอะมิโนอิสระ (K. Witjitra, 1996; SN WALFORD, 1996) จึงมีช่วยส่งเสริมการผลิตในกระบวนการผลิตตัวทำละลายได้ดี

เมื่อพิจารณาถึงค่าจลนศาสตร์ของการหมักเมื่อเปรียบเทียบการใช้ไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผงชูรส) ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) พบว่า การเพิ่มแอมโมเนียมอะซิเตตมีผลต่อการส่งเสริมการเพิ่มมวลเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงอย่างเดียว โดยการใช้แอลไลซีนร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ μ สูงสุดถึง 0.086 ชั่วโมง$^{-1}$ หรือ คิดเป็น 6 เท่าของการใช้แอลไลซีนเพียงอย่างเดียว รองลงมา คือ การใช้ยีสต์สกัดกับแอมโมเนียมอะซิเตต (0.041ชั่วโมง$^{-1}$) ซึ่งเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากการใช้ยีสต์สกัดอย่างเดียว ส่วนการใช้กากผงชูรสกับแอมโมเนียมอะซิเตตนั้น ให้ค่า μ ต่ำที่สุดเพียง 0.023ชั่วโมง$^{-1}$ โดยมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับค่าที่ได้เป็น 0.027ชั่วโมง$^{-1}$ จากการใช้กากผงชูรสอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลของความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จากตารางที่ 4.5

เมื่อพิจารณาการสร้างกรดรวม พบว่า การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับยีสต์สกัดหรือแอลไลซีนมีผลทำให้ค่า Q_{ac} และ ν_{ac} มีค่าต่ำลงจากค่าที่ได้จากการใช้ยีสต์สกัดหรือแอลไลซีนเพียงชนิดเดียว ส่วนการใช้ร่วมกับกากผงชูรส พบว่า Q_{ac} มีค่าลดลงเช่นกัน แต่เมื่ออัตราการผลิตกรดต่อมวลเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่ำ จึงส่งผลให้ ν_{ac} มีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยการใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผงชูรส ให้ค่า Q_{ac} เป็น 0.12, 0.12 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วน ν_{ac} เป็น 0.03, 0.163 และ 0.226 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ส่วนการผลิตตัวทำละลายรวม พบว่า การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลที่แตกต่างกัน คือ การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับยีสต์สกัด จะให้ค่า $\mathbf{Q}_{sol}$ ลดลงเท่ากับ 0.166 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ เทียบเป็น 0.87 เท่า ของการใช้ยีสต์สกัดอย่างเดียว แต่ค่า $\boldsymbol{\nu}_{sol}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.293 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง หรือเพิ่มขึ้น 4 เท่า แสดงว่า การใช้แหล่งไนโตรเจนร่วมให้ผลส่งเสริมประสิทธิภาพเซลล์ต่อการสร้างตัวทำละลายให้ดีขึ้น รวมทั้งเซลล์มีการใช้น้ำตาลในการสร้างตัวทำละลายดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าผลได้บิวทานอลที่เพิ่มจากร้อยละ 17.10 เป็น 26.49 ส่วนค่าผลได้ตัวทำละลายรวมที่เพิ่มสูงจากร้อยละ 25.73 เป็น 35.95

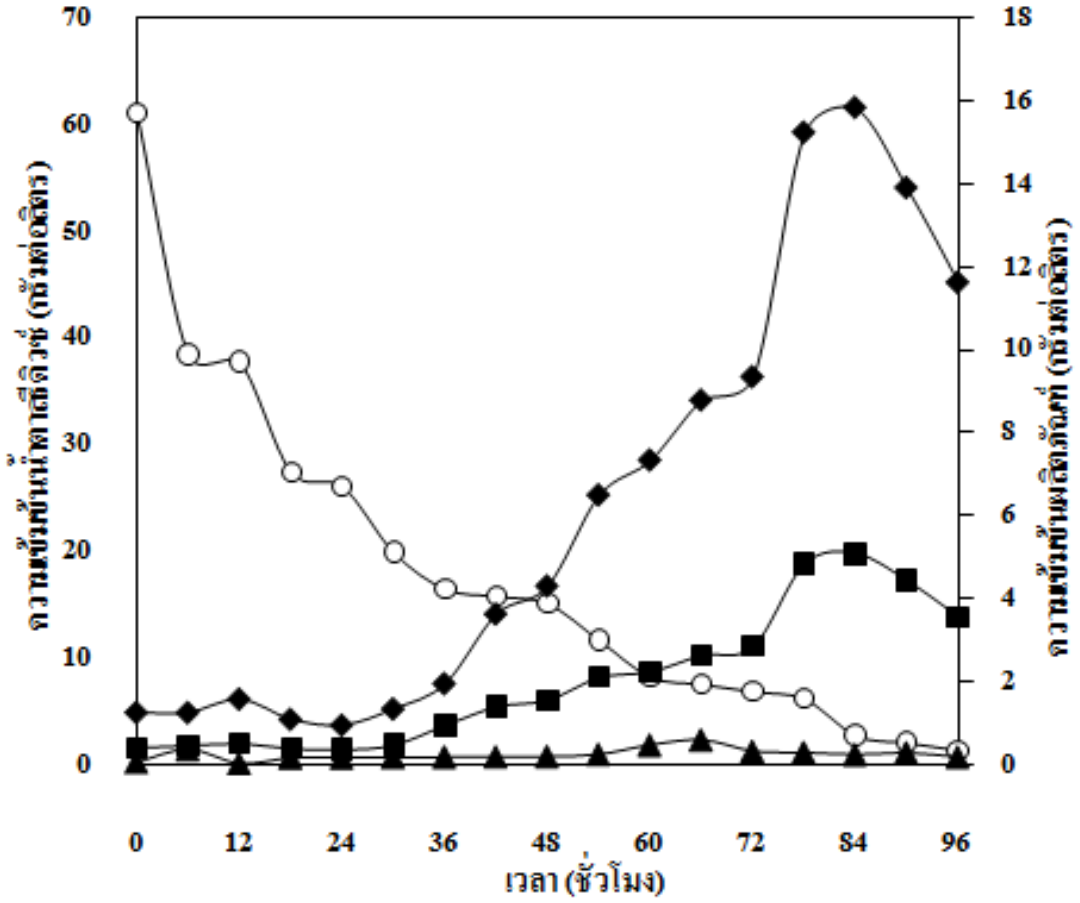
การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับแอลไลซีน จะมีผลทำให้ค่า $\mathbf{Q}_{sol}$ และ $\boldsymbol{\nu}_{sol}$ ลดลงโดยให้ค่า $\mathbf{Q}_{sol}$ เท่ากับ 0.075 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือ เทียบเป็น 0.6 เท่า ของการใช้แอลไลซีนอย่างเดียว และค่า $\boldsymbol{\nu}_{sol}$ มีค่า **0.122** กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง หรือ เทียบเป็น 0.5 เท่าเช่นกัน แต่อย่างไรก็ดี การเสริมแอมโมเนียมอะซิเตต จะมีผลให้การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายดีขึ้น โดยทำให้ค่า

ผลได้บิวทานอลที่เพิ่มจากร้อยละ 14.05 เป็น 15.70 ส่วนค่าผลได้ตัวทำละลายรวมที่เพิ่มสูงจากร้อยละ 21.79 เป็น 22.69

การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับกากผงชูรส จะให้ค่า $\mathbf{Q}_{sol}$ 0.073 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้กากผงชูรสอย่างเดียว แต่ค่า $\boldsymbol{\nu}_{sol}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.172 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง หรือเพิ่มขึ้น 6.3 เท่า แสดงว่า การเสริมแอมโมเนียมอะซิเตต จะมีผลให้การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายดีขึ้นเช่น โดยทำให้ค่าผลได้บิวทานอลที่เพิ่มจากร้อยละ 12.86 เป็น 19.80 ส่วนค่าผลได้ตัวทำละลายรวมที่เพิ่มสูงจากร้อยละ 16.43 เป็น 26.83

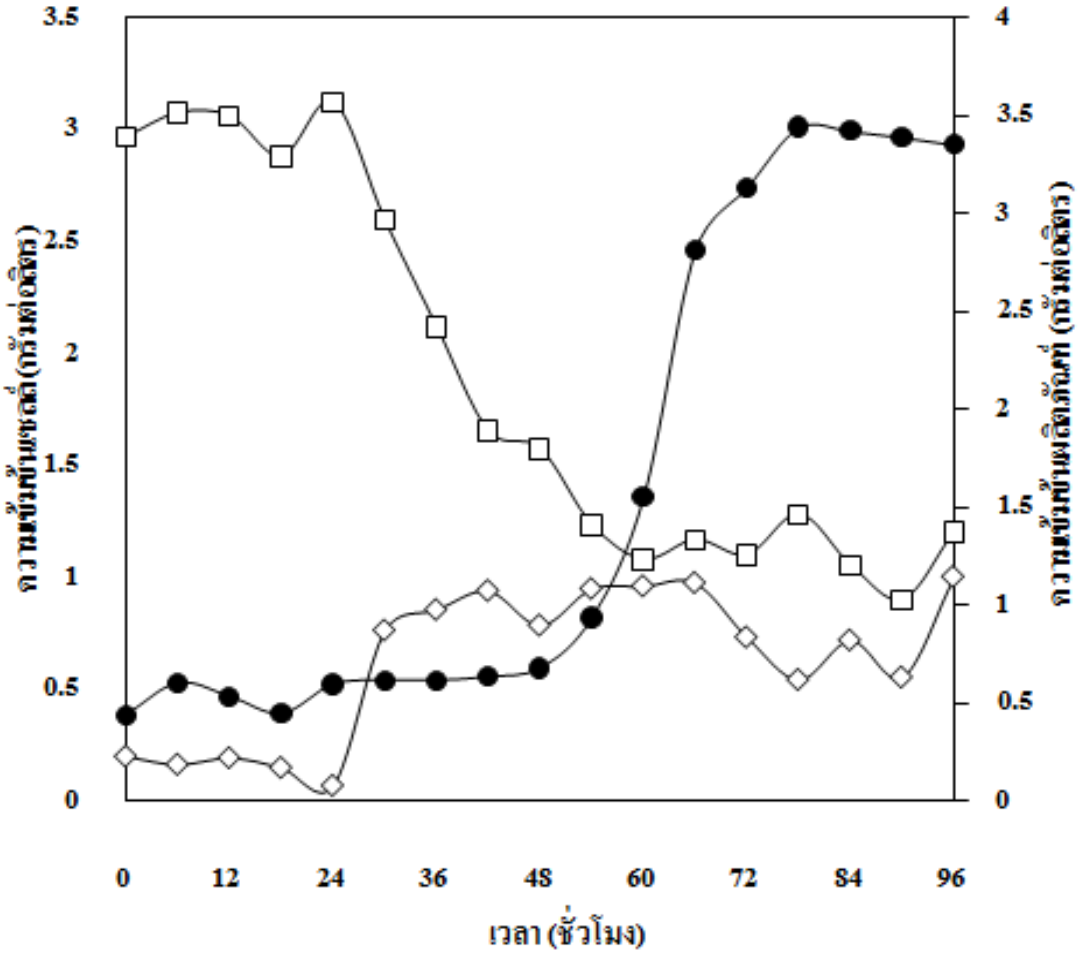
จากผลที่ได้นั้นการหมักเพื่อผลิตบิวทานอล และตัวทำละลายทั้งหมด เมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ผลเสริมต่อประสิทธิภาพของเซลล์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายในทุกสภาวะ โดยการใช้แอมโมเนียมอะซิเตตร่วมกับยีสต์สกัด ให้ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของที่ผ่านที่ได้รายงานว่า การหมักโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์จะให้ผลผลิตตัวทำละลายดีกว่าการหมักโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ หรือ ไนโตรเจนอนินทรีย์เพียงอย่างเดียว (Welsh และคณะ, 1986; อังคณาและคณะ, 2010; นันทนัช และคณะ, 2011)

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของกระบวนการผลิตบิวทานอลในงานวิจัยนี้ คือ กระบวนการหมักด้วยเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 จากการใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร (อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่สภาวะไร้ออกซิเจนด้วยกระบวนการหมักแบบกะ) โดยการใช้ยีสต์สกัด (8.41 กรัมต่อลิตร) ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต (3 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน มีส่วนช่วยส่งเสริมปริมาณตัวทำละลายรวม และบิวทานอลสูงสุด โดยมีความสอดคล้องกับอัตราส่วนของอะซิโตน: บิวทานอล: เอทานอล เป็น 8:26:1 ในงานวิจัยนี้ถึงแม้ว่า จะมีการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่น (แอลไลซีน และกากผงชูรส) ที่มีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่า แต่ก็ให้ประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ด้อยกว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อยู่ดี

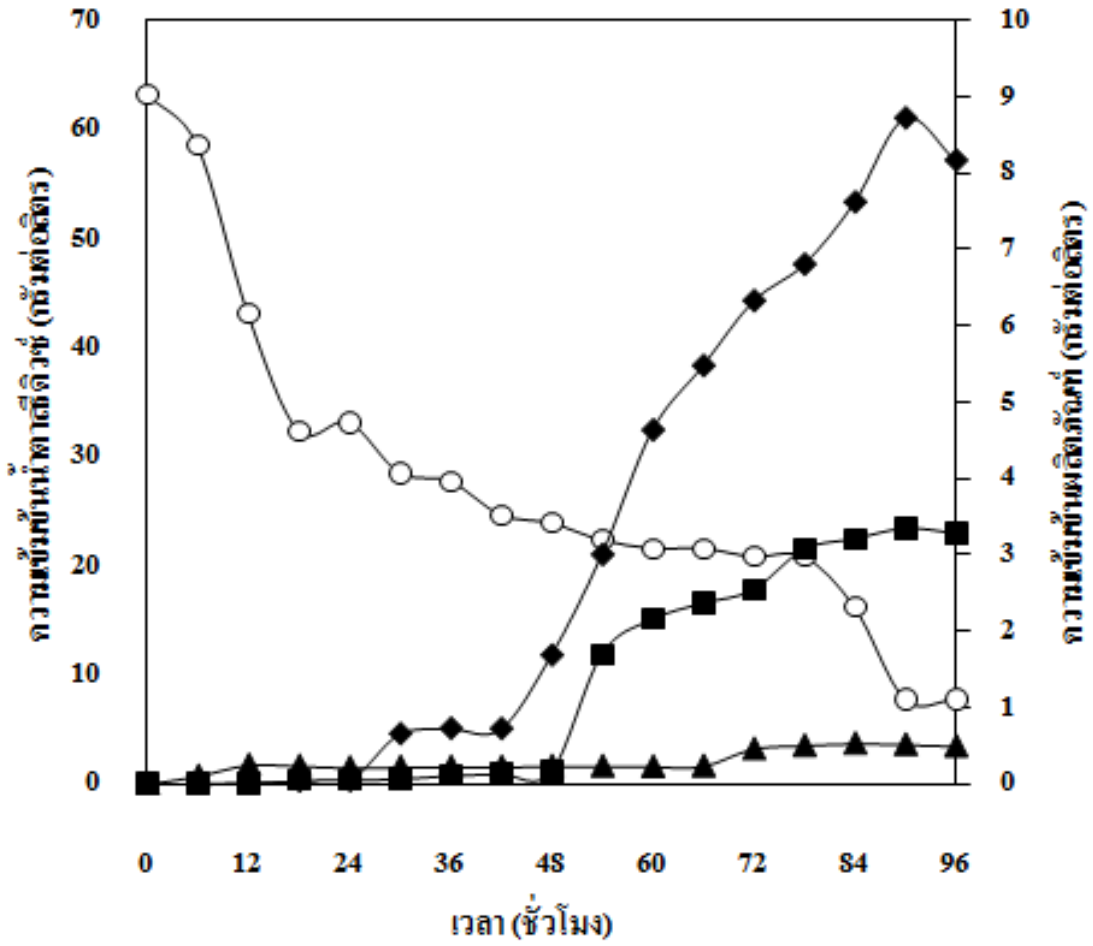


รูปที่ 4.32 ความเข้มข้นตัวทำละลาย และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

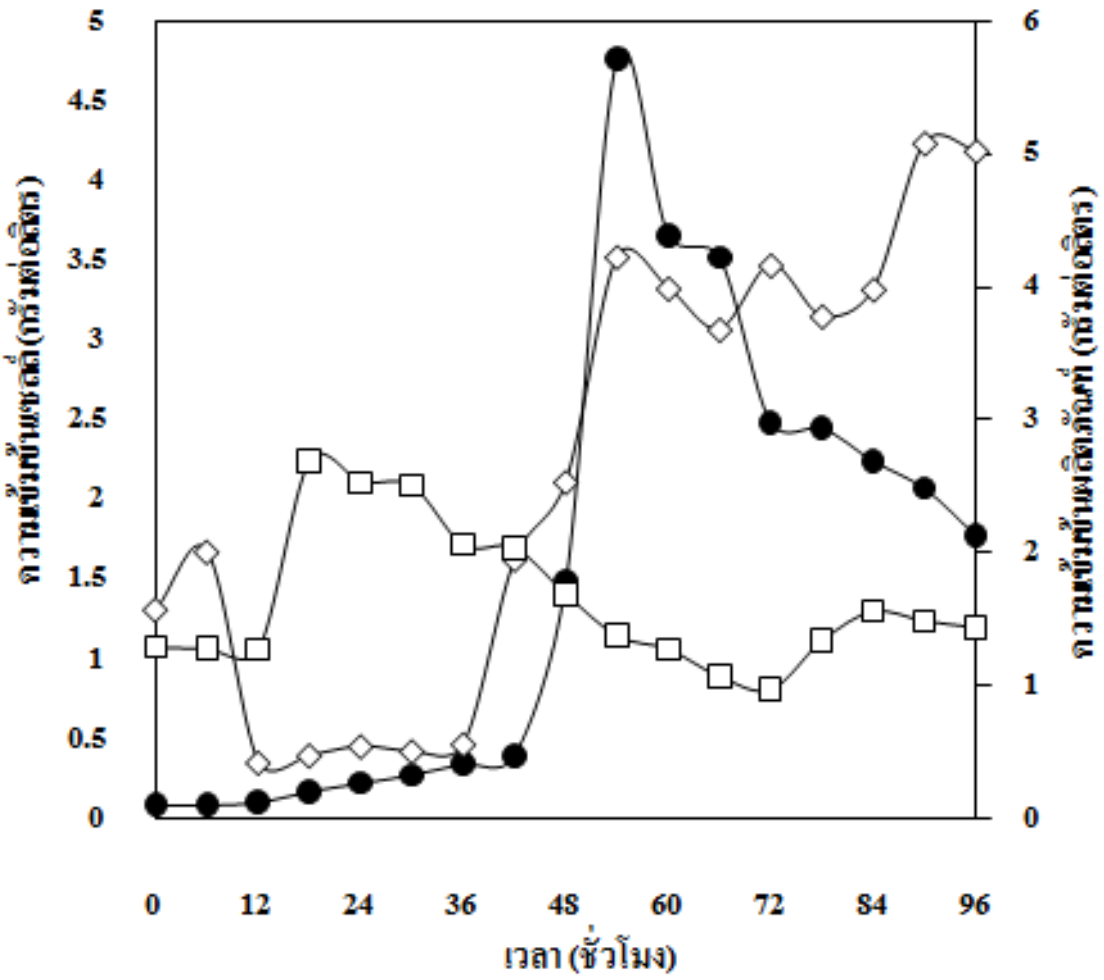


รูปที่ 4.33 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้สารสกัดยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

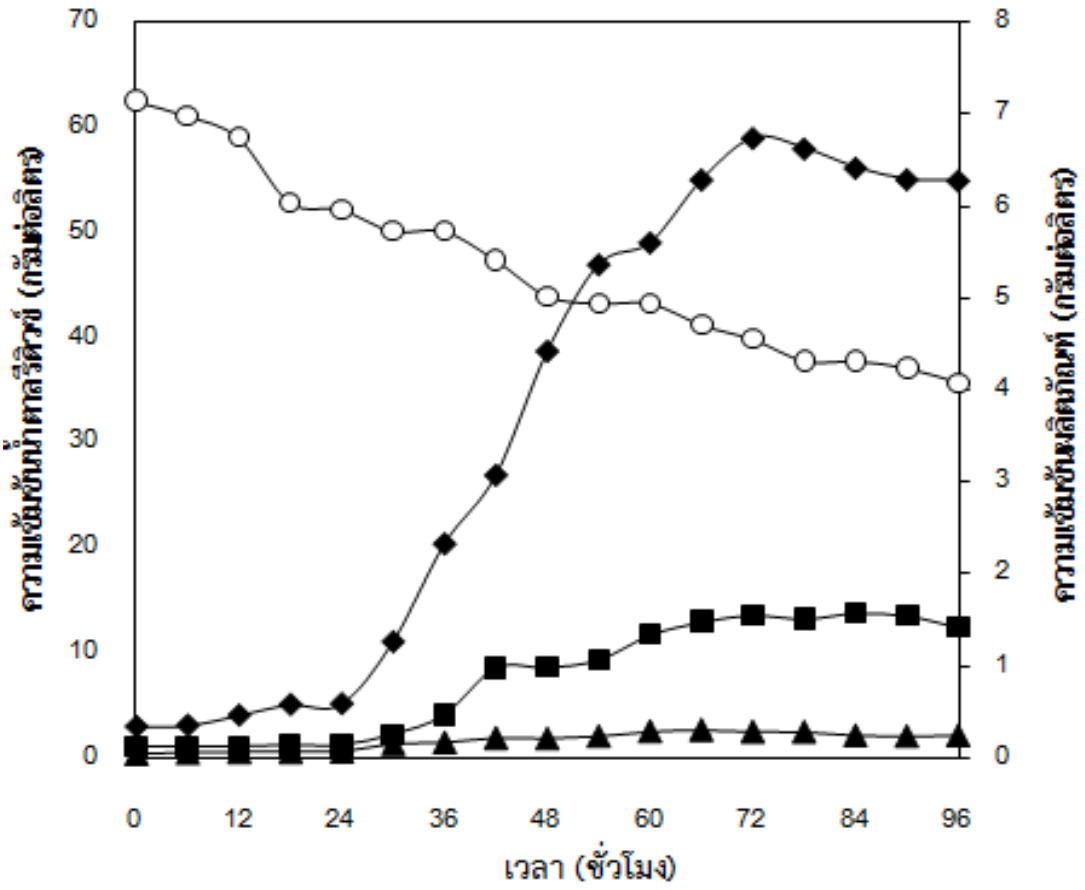


รูปที่ 4.34 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

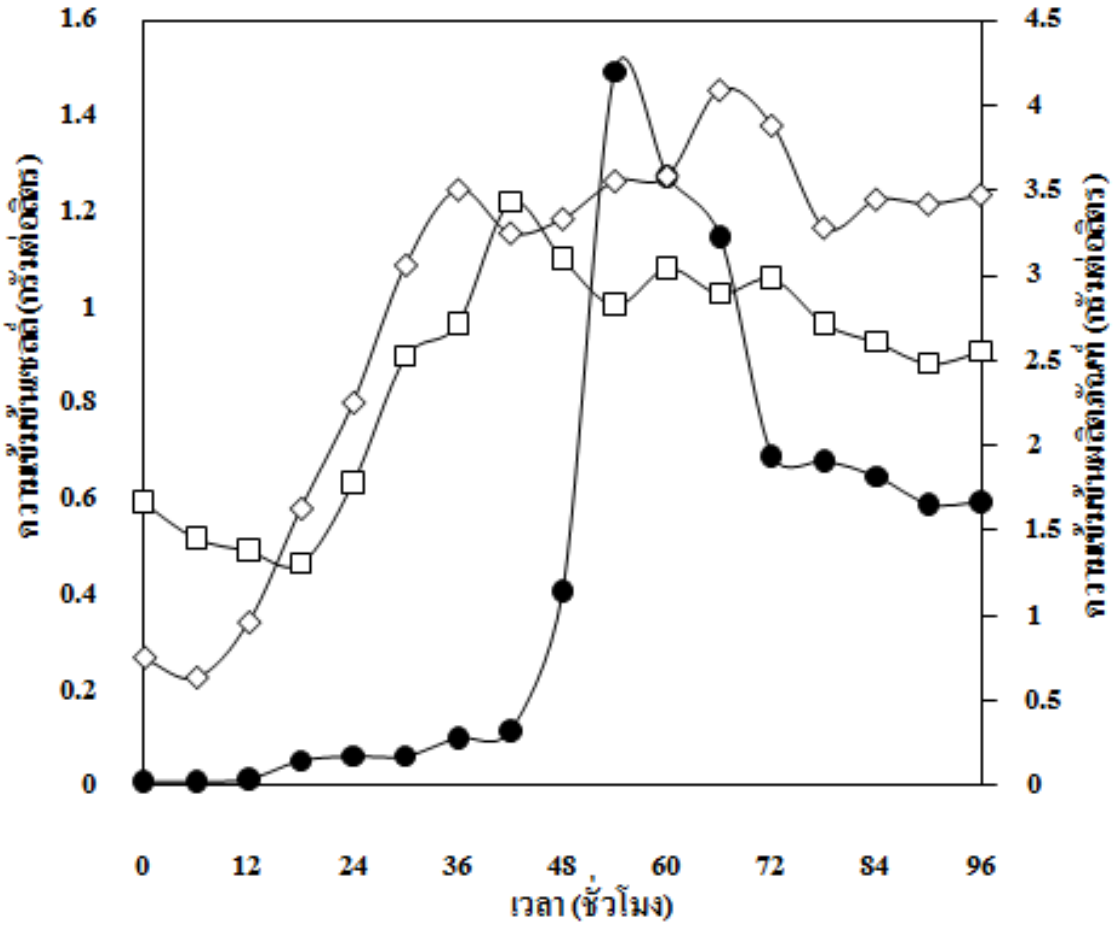


รูปที่ 4.35 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้แอลไลซีนยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



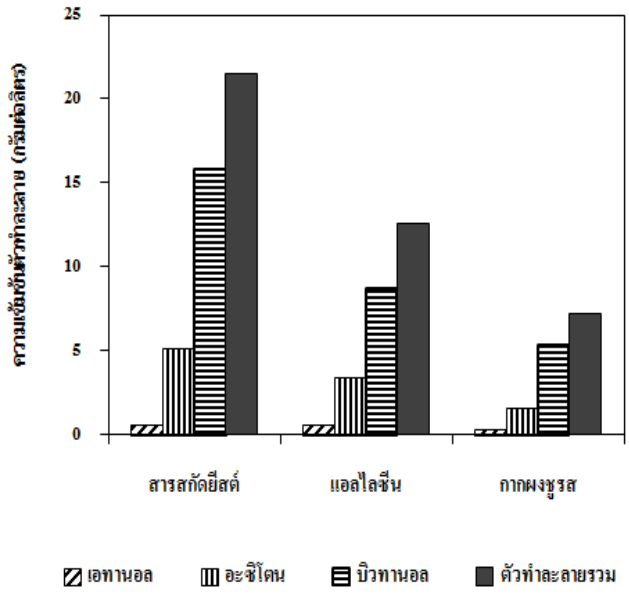
รูปที่ 4.36 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย น้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน.ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ น้ำตาลรีดิวซ์ ◆ บิวทานอล ■ อะซิโตน ▲ เอทานอล

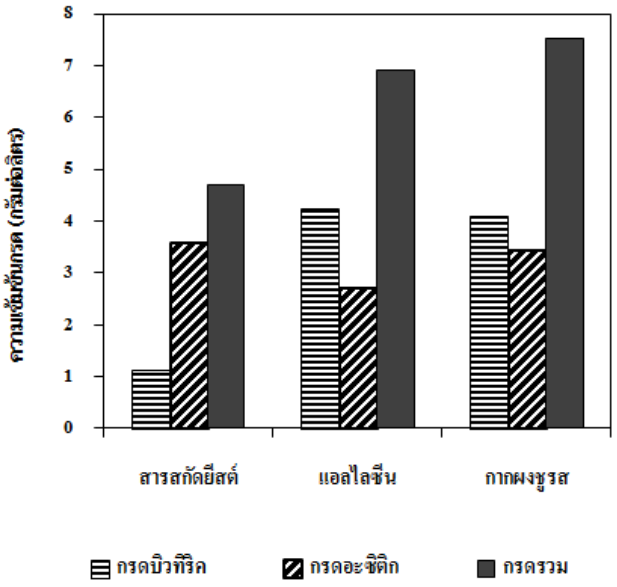


รูปที่ 4.37 ความเข้มข้นกรด และผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย โดยใช้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

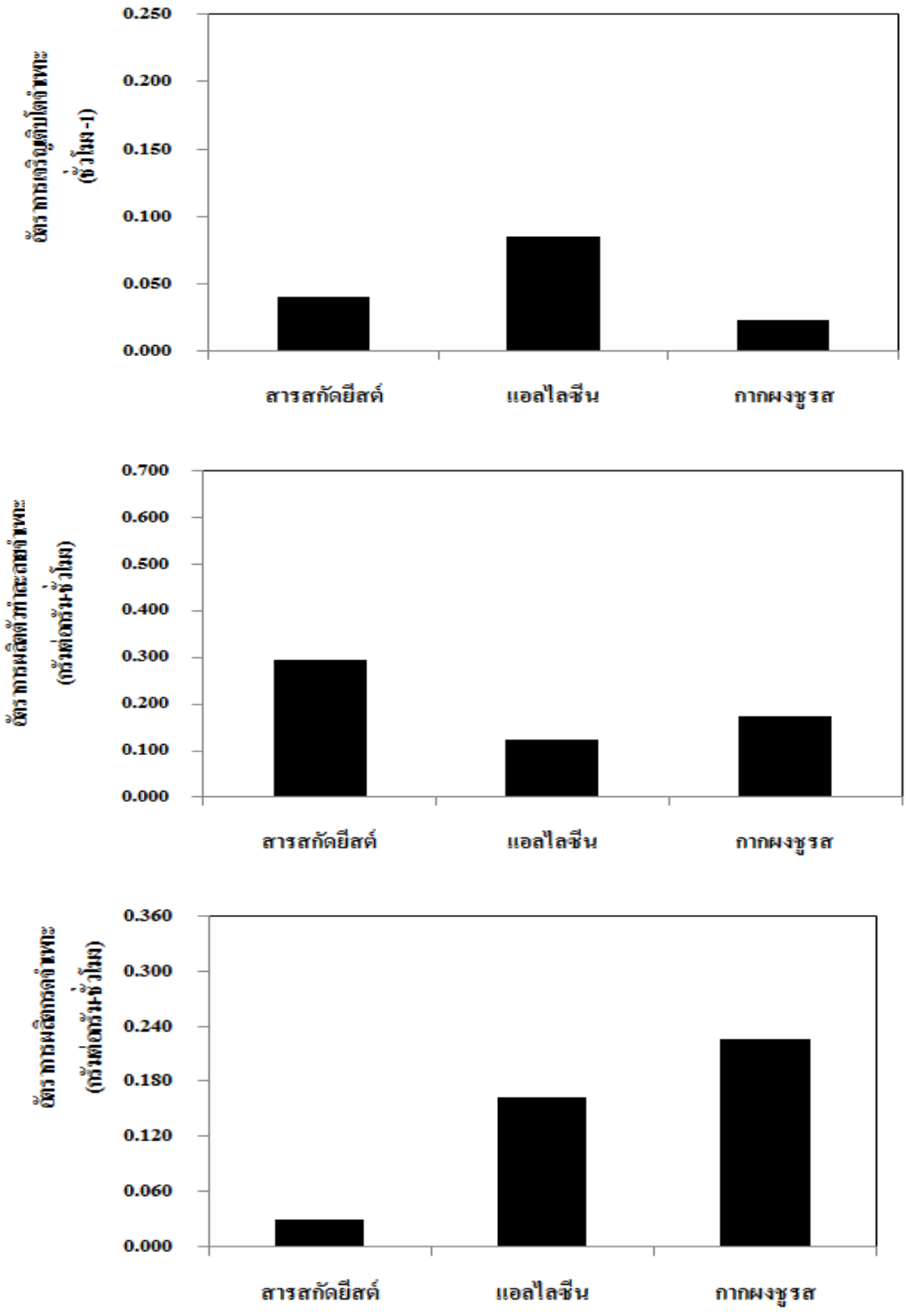
● เซลล์ ◇ กรดบิวทิริก □ กรดอะซิติก



รูปที่ 4.38 ผลของแหล่งอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) ไนโตรเจนต่อการผลิตตัวทำละลาย โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.39 ผลของแหล่งอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต) ไนโตรเจนต่อการผลิตกรด โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.40 การเปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของการหมักแบบกะ ด้วย *C. saccharobutylicum* ATCCBAA 117 ที่แปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด 5.0

ตารางที่ 4.5 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ต่อการผลิตตัวทำละลายและกรดในกระบวนการหมักแบบกะโดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ชนิดของแหล่งอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ (แอมโมเนียมอะซิเตต)ไนโตรเจน		
	สารสกัดยีสต์	แอลไลซีน	กากผงชูรส
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	5.08	3.35	1.58
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	15.83	8.71	5.31
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.6	0.53	0.3
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	21.51	12.59	7.19
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	1.12	4.22	4.09
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	3.57	2.69	3.43
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	4.69	6.91	7.52
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	61.14	63.18	62.52
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	59.76	55.48	26.8
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	3.01	4.76	1.49
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	26.49	15.70	19.81
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	35.99	22.69	26.83
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	7.85	12.45	28.06
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.118	0.048	0.052
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.166	0.075	0.073
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.117	0.122	0.140
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.041	0.086	0.023
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.204	0.078	0.798
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.293	0.122	0.174
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.030	0.163	0.226

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำอ้อยที่เหมาะสมต่อคลอสตริเดียมสามสายพันธุ์

ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมต่อเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 คือ 80 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่า รวมทั้งมีค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จำเพาะเป็น 1.4 เท่า เมื่อเทียบกับการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมต่อเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ในสูตรอาหารสูตรที่ 1 คือ 60 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่า รวมทั้งมีค่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จำเพาะเป็น 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 80 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อเชื้อ *C.saccharobutylicum* ATCC BAA 117 คือ 60 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลาย เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีโดยไม่มีระยะการปรับตัว (lag phase) จึงทำให้มีค่าผลได้การผลิตตัวทำลายรวมและบิวทานอล สูง ภายในเวลา 96 ชั่วโมง รวมทั้งอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ และบิวทานอลจำเพาะ มีค่าสูงกว่าคิดเป็น 1.85 เท่า เมื่อเทียบกับการหมักที่ 80 กรัมต่อลิตร การหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงของเชื้อสายพันธุ์นี้ เซลล์มีการปรับตัวเข้าให้เข้ากับความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงนานถึง 42 ชั่วโมง แม้จะมีมวลเซลล์ในระบบสูงกว่า โดยคิดเป็น 2.26 เท่า แต่ให้ปริมารผลผลิตตัวทำละลายรวมและบิวทานอลใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 มีความเหมาะสมต่อต่อการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายรวมและบิวทานอลจากน้ำอ้อยในอาหารสูตรที่ 1 สูงกว่าจุลินทรีย์อีกสองสายพันธุ์

ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อ *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 การหมักแบบกะ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที สภาวะไร้ออกซิเจน โดยแปรผันตามสูตรอาหารที่ 2-7 ดังตารางที่ ก. ได้ผลดังนี้ คือ

5.1.2 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว

เมื่อทำการเปรียบเทียบการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ ยีสต์สกัด แอลไลซีน และกากผงชูรส เมื่อใช้น้ำหนักไนโตรเจนในองค์ประกอบเท่ากับ 1.46 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเหมาะสมมากที่สุด โดยเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้ดี

และผลิตตัวทำละลายได้สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อีกสองชนิด (แอลไลซีน, กากผงชูรส) เนื่องจากยีสต์สกัดอุดมไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดที่ช่วยเสริมสร้างการสร้างโปรตีนภายในเซลล์และโครงสร้างของเซลล์โดยตรง (สมใจ ศิริโภค, 2555) รวมทั้งอุดมด้วยวิตามิน และแร่ธาตุ ที่จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่างๆที่จำเป็นต่อกิจกรรมภายในเซลล์ต่างๆ และวิถีการผลิตตัวทำละลาย โดยที่สภาวะนี้ เชื้อผลิตตัวทำละลายรวมได้ 16.06 กรัมต่อลิตร หรือคิดเทียบกับค่าที่ได้จากการใช้แอลไลซีน และกากผงชูรส เป็น 4.25 และ 2.393 เท่าตามลำดับ ส่วนอัตราส่วนองค์ประกอบแอลกอฮอล์ทั้ง 3 ชนิด เป็นอะซีโตนต่อบิวทานอลต่อเอทานอล (A: B: E) เท่ากับ 10.7: 23.2: 1 ให้บิวทานอลในสัดส่วนที่สูงที่สุดเช่นกัน

การหมักที่ใช้แอลไลซีนที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ ได้มวลเซลล์ และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้ยีสต์สกัด และกากผงชูรส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีแต่กรดอะมิโนชนิดเดียว ไม่มีกรดอะมิโนชนิดอื่นๆที่จำเป็นมาใช้เสริมสร้างโปรตีน และโครงสร้างของเซลล์ รวมทั้งไม่มีแหล่งวิตามินหรือแร่ธาตุที่ช่วยในกิจกรรมต่างๆของเอนไซม์ ทำให้มีปริมาณกรดรวมเหลือสูง 10.38 กรัมต่อลิตร หรือ คิดเป็น 4.24 เท่า ของค่าที่ได้จากการใช้ยีสต์สกัด อย่างไรก็ดี กรดอะมิโนชนิดแอลไลซีน มีผลช่วยให้การผลิตตัวทำละลายเกิดได้อย่างมีประสิทธิในระดับหนึ่ง คือ ผลิตตัวทำละลายรวม 11.25 กรัมต่อลิตร โดยมีบิวทานอลน้อยกว่า (7.27 กรัมต่อลิตร)ในขณะที่ปริมาณอะซีโตน และเอทานอลมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการใช้ยีสต์สกัด ส่วนอัตราส่วน A: B: E เท่ากับ 10.4: 20.8: 1 ให้บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นกัน

การหมักที่ใช้กากผงชูรสที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่า เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีที่สุด มีปริมาณมวลเซลล์เข้มข้นมากที่สุดเมื่อเทียบกับเป็น 1.3 หรือ 2.3 เท่าของมวลที่ได้จากการหมักที่ใช้ยีสต์สกัด และแอลไลซีน สอดคล้องกับปริมาณกรดรวมสูงสูดที่มีถึง 10.4 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตตัวทำละลายรวมเกิดได้ต่ำที่สุด เพียง 6.71 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดรวม และน้ำตาลเหลือในระบบสูงถึง 9.22 และ 20.80 กรัมต่อลิตร ภายหลังเมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยอัตราการผลิตบิวทานอล และตัวทำละลายจำเพาะมีค่าน้อยที่สุดเช่นกัน ส่วนอัตราส่วน A: B: E เท่ากับ 4.8: 21.04: 1 ให้บิวทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นกัน จากข้อมูลที่ได้รับจากบริษัท พบว่า กากผงชูรสมีกรดอะมิโนชนิดกลูตามิค เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือ อะลานีน กรดเอสพาติค และไลซีน ตามลำดับ พร้อมทั้งกรดอะมิโนอีก 9 ชนิด (บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด, 2546) นอกจากนี้การใช้สารเคมีในกระบวนตกตะกอนกรดกลูตามิค อาจมีส่วนทำให้กากผงชูรสเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเพิ่มมวลเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์นี้มากกว่า

5.1.3 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์

การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยกำหนดให้ใช้แอมโมเนียมอะซิเตต เท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ทำการแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (ยีสต์สกัด, แอลไลซีน, กากผงชูรส) ตามปริมาณไนโตรเจนที่วิเคราะห์จากองค์ประกอบ ได้ผลดังนี้ คือ

การใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการผลิตตัวทำละลายสูงขึ้นอย่างเด่นชัดกว่า การหมักที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดเดียว โดยเฉพาะการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ การหมักที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต เชื้อจุลินทรีย์ผลิตตัวทำละลายรวมเพิ่มมากขึ้นเป็น 21.51 กรัมต่อลิตร โดยเพิ่มเฉพาะความเข้มข้นบิวทานอลขึ้นอีก 5.6 กรัมต่อลิตร ทำให้มีอัตราส่วน A: B: E เท่ากับ 8: 26: 1 เชื้อสามารถเปลี่ยนอะซิเตตให้เป็นบิวทานอลได้มากขึ้น ส่งผลให้เพิ่มอัตราส่วนบิวทานอลอย่างมีนัยสำคัญ

การหมักที่ใช้แอลไลซีนร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต พบว่า การเติมไนโตรเจนอนินทรีย์ มีผลทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยให้มวลเซลล์สูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 2.75 เท่าเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้แอลไลซีนอย่างเดียว นอกจากนี้การสร้างผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น แม้ว่า ปริมาณตัวทำละลายรวมและบิวทานอลจะเพิ่มไม่มาก แต่อัตราการการสร้างผลิตภัณฑ์และมวลเซลล์มีค่าสูงอย่างเด่นชัด

การหมักที่ใช้กากผงชูรสร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลง ทำให้ให้มวลเซลล์น้อยเหลือเพียง 0.28 เท่า เมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้กากผงชูรสอย่างเดียว และการใช้น้ำตาลของเชื้อได้เพียง 26.8 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากกากผงชูรสมีความเข้มข้นไนโตรเจนต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อีก 2 ชนิด จึงต้องใช้เติมในปริมาณที่สูง เพื่อให้มีสัดส่วนของไนโตรเจนคงที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นความเข้มข้นโดยรวมของอาหารที่สูงนี้ จึงมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้มวลเซลล์ต่ำแต่เซลล์สามารถผลิตตัวทำละลายมีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยมีอัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ และอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมีค่าสูงขึ้น การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์สูงขึ้นเช่นกัน

จากผลการทดลองที่ได้สรุปได้ว่า การใช้แอมโมเนียมอะซิเตตเป็นไนโตรเจนอนินทรีย์ร่วมกับไนโตรเจนอินทรีย์สำหรับการหมักบิวทานอล จะมีผลส่งเสริมประสิทธิภาพของเชื้อ *C.saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ในการผลิตตัวทำลายรวมให้สูงกว่าการหมักที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงชนิดเดียว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของอังคณา (2010) และนันทนัช (2011) โดย Yang Gu และคณะ (2009) รายงานถึงการเติมแอมโมเนียมอะซิเตตว่า มีส่วนเพิ่มกระบวนการสร้างตัวทำละลาย (Soventogenesis) และการสะสมของกรดอะซีติก และกรดบิวทีริกในขั้นตอนการสร้างกรด (Acidogenesis) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของการถอดรหัส

ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างกรด (ยีน*askc* และยีน*buk*) และการสร้างตัวทำละลาย (ยีน *adc*, ยีน*ctf*AB, ยีน*adh*E และยีน*bdh*B) ของเชื้อ *C. acetobutylicum* EA 2018

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของกระบวนการผลิต บิวทานอลคือ การใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมอะซิเตต ให้ปริมาณบิวทานอลสูงสุด โดยใช้ปริมาณของยีสต์สกัด และแอมโมเนียมอะซิเตต 8.4 และ 3 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สภาวะไร้ออกซิเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบกะ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1. ควรศึกษาการปรับสัดส่วนของ L-lysine และกากผงชูรสที่เหมาะสมต่อการผลิตบิวทานอล เนื่องจากเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากอุตสาหกรรมที่มีราคาถูก

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และพูลพร แสงบางปลา. 2544. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต n-Butanol จากวัสดุทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน. ทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาวิศวกรรมจากศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544

จิรวรรณ แก้วรัตน์. การผลิตสาร 1,3-โพรเพนไดออลจากกลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดย Clostridium butyric DSM 5431 และการลดค่าใช้จ่ายในการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2555.

ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล และจิรกานต์ เมืองนาโพธิ์. การผลิตบิวทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายผักตบชวา. The 2nd AUN Regional conference on Natural Resources and Materials. วันที่ 6-7 สิงหาคม. ยอร์กจาร์การ์ต้า ประเทศอินโดเนียเซีย, 2552

นันทนัช สานสนานนท์. ผลของแหล่งไนโตรเจนภายในประเทศสำหรับกระบวนการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิศวกรรมเคมีคณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2554.

บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ ประเทศไทย จำกัด. กรดอะมิโนในกากผงชูรสโรงงานพระประแดงข้อมูล, 2546.

สำนักนโยบายและพลังงาน กระทรวงพลังงาน, สถานการพลังงานปีและแนวโน้ม พ.ศ. 2555 [ออนไลน์], 12 กันยายน พ.ศ. 2555, แหล่งที่มา www.energy.go.th/sites/all/situation54_trend55.pdf.

สำนักนโยบายและพลังงาน กระทรวงพลังงาน, สถานการพลังงานปีและแนวโน้ม พ.ศ. 2555 [ออนไลน์], 23 กันยายน พ.ศ. 2555, แหล่งที่มา http://www.energy.go.th/index.php?q=node/384

สุรทร กาญจนทวี. ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสารละลายอินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะด้วยเชื้อ Clostridium acetobutylicum จากกากน้ำตาล. รายงานการวิจัย ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537: หน้า 54.

สมใจ ศิริโภค, จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อส่งเสริมกรุงเทพ, 2555). หน้า 80-100

อังคณา สุจริต. การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการ หมักแบบกะ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.

ภาษาอังกฤษ

Buchanam, R.E. and Gibbons, N.E.1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Co. Bartimore.

Cirilo, N.H., Crabbeb, E., Badilloa, C.M., Zarrabalc, O.C., Morad, M.A., Cortazara, F., G.P., Hernández and Ishizakie , A. Bioconversion of industrial wastewater from palm oil processing to butanol by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). J. Cleaner Production. Vol.16 (2008): 632-638.

David, T.J. and David, R.W. Acetone-butanol Fermentation Revisited. Microbiologycal Reviews. 50,4 (1986): 484-524

.Dürre P., Biobutanol: An attractive biofuel. Biotechnol J 2 (2007):1525–1534.

Gapes, J. R., Swoboda, H., Haslinger, A., Nimcevic, D. The effect of heat shocking on batch fermentation by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592. Appl. Microbiol Biotechnol. 54 (2000): 118-120.

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

Gottwald, M., H. Hippe, and G. Gottschalk. Formation of n-butanol from D-glucose by strains of "Clostridium tetanomorphum" group. Appl. Environ. Microbiol. 48 (1984): 573-576.

Grott schall, G. and Bahl H. Feasible improvement of the Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum*, Trends in the Biological of Fermentation for Fuels and Chemical (Hollander, A.ed). Plemum Press New York (1981): 463-471.

Joseph W. ROOS, Joseph K. McLaughlin,t and Eleftherios T. PapoutsakisS. The Effect of pH on Nitrogen Supply, Cell Lysis, and Solvent Production in Fermentations of *Clostridium*

acetobutylicurn. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING VOL. 27 (1985): pp 681-694

K. Witjitra, M. M. Shah, and M. Cheryan. Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. Enzyme and Microbial Technology. 19 (1996): 322-327

Khare, S.K., Krishna,J. and Gandhi, A.P. Citric Acid production from Okara (soy residue) by Solid-state Fermentation. Bioresource Technol. 54 (1995): 323-325

Lee, J., Mitchell, W.J., Tangney, M. and Blaschek, H.P. Evidence for the presence of alternative glucose transport system in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent hyper producing mutant BA101. Appl Environ Microbiol. 71 (2005): 3384-3387.

Linda, K.B. and Ellefson. Appl.Environ Microbiol. 50, 5 (1985): 1165-1170.

Lundie, L. L. and Drake, H. L. Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. J. Bacterial.159 (1984): 700

Lay, J.J. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. Biotechnol. Bioeng. 74 (2001): 280-287.

Mitchell, W.J. Physiology of carbohydrates to solvent conversion by clostridia. Adv Microb Physio. Vol.39 (1998): 31-130

Mohd Sahaid Kalil, Hisham Salem Alshiyab, and Wan Mohtar Wan Yusoff. Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Production using *C.acetobutylicum*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (2008): 393-401.

Monot, F., Martin, J.R., Petitdemange, H. and Gay, R. Acetone and Butanol Production by *Clostridium* acetobutylicum in a Synthetic Medium. Applied and Environmental Microbiology. 44, 6 (1982):1318-1324.

Monot, F., Martin, J.R., Petitdemange, H. and Gay, R. Acetone and Butanol Productionby *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium. Applied and Environmental Microbiology. 44, 6 (1982):1318-1324.

Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. Bioresour Technol. 96 (2005): 986-1993.

M.S. Madihah, A.B. Ariff, K.M. Sahaid, A.A.Suraini and M.I.A. Karim. Direct Fermentation of gelatinized sago sago srarch to acetone-butanol-ethanol by clostridium acetobutylicum. World journol of microbiology and biotechnology 17 (2001): 567-576.

Nasib Qureshi, Badal C. Saha, Ronald E. Hector, Stephen R. Hughes, Michael A.Cotta. production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—Batch fermentation, Biomass and Bioenergy, Volume 32, Issue 2, (2008): 168–175

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

Purwadi, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J. Kinetic study of detoxification of dilute acid hydrolysates by $Ca(OH)_2$. J Biotechnol.Vol.114 (2004): 187-198.

Qureshi, N., Li, X.L., Hughes, S., Saha, B.C., Cotta, M.A. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol Prog. 22 (2006): 673-680.

Sang, Y.L., Jin H.P., Seh,H.J., Lers,K.N., Jaehyum,K. and Kwang,S.J. Fermentative Butanol Production byClostridia. Biotecnology and Bioengineering.101 No.2 (Oct. 2008): 209-228.

Shaheen, R., Shirley M., and Jones, T. D. Comparative Fermentation Stidies of Industrial Strains Belonging to Four Species of Solvent-Producing Clostridia.J. Mol. Microbiol. Biotechnol.2, 1 (2000): 115-124.

SN WALFORD, COMPOSITION OF CANE JUICE. Sugar Milling Research Institute, University of Natal, King George V Avenue, Durban, (1996): 265-266.

Stanbury, P.F.and A. Whitaker. Principle of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon press. (1984) Page 76, 81

Susanna Carcano and Nicola Parolini, A MODEL FOR CELL GROWTH IN BATCHC BIOREACTORS, (POLITECNICO DI MILANO FACOLTÀ DI INGEGNERIA DEI SISTEMI Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Matematica) 2010: 30

Welsh F W, Williams RE, Veliky IA. A note on the effect of nitrogen source on growth of and solvent production by *Clostridium acetobutylicum.* J Appl Bacteriol 61 (1986): 413-419

Tadahiro Karasawa, Sayuri Ikoma, Kiyotaka Yamakawa and Shin ichi Na kamura. A defined growth medium for *Clostridium difficile*. Microbiology 14: (1995) 371-375.

Organotechnie S.A.S.Yeast Extract 19512. Standard series edition 04/2008.

Tangney, M. and Mitchell W.J. Analysis of a Catabolic Operon for Sucrose Transport and Metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J.Microbial. Biotechnol. 2, 1 (2000): 71-80.

Tarkow, H. and Feist, C.S. Adv. Chem. Ser. 95 (1969) :197

Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S. High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose feeding Method. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol.98.No.4 (2004): 263-268.

T.C. Ezeji, N. Qureshi, H. P. Blaschek . Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. Applied Microbiology and Biotechnology, February 2004, Volume 63, Issue 6 (2004): 653-658.

Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H., Dale, B.E. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. Bioresour Technol. Vol.96 (2005): 2014-2018.

Yang Gu Shiyuan Hu Jun Chen Lijun Shao. Ammonium acetate enhances solvent production by Clostridium acetobutylicum EA 2018 using cassava as a fermentation medium. J Ind Microbiol Biotechnol 36 (2009): 1225–1232

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรสารอาหารในการหมัก

ตารางที่ ก. สารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)						
	อาหารสูตรที่ 1 *	อาหารสูตรที่ 2	อาหารสูตรที่ 3	อาหารสูตรที่ 4	อาหารสูตรที่ 5	อาหารสูตรที่ 6	อาหารสูตรที่ 7
K_2HPO_4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Tryptone	6	-	-	-	-	-	-
CH_3COONH_4	3	-	-	-	3	3	3
Yeast extract	2	13.18	-	-	8.41	-	-
L-Lysine	-	-	19.57	-	-	12.30	-
Ami-Ami (กากผงชูรส)	-	-	-	29.12	-	-	18.14
น้ำตาลรีดิวส์	60, 80	60	60	60	60	60	60

***สูตรอาหาร อังคณา, 2010**

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล

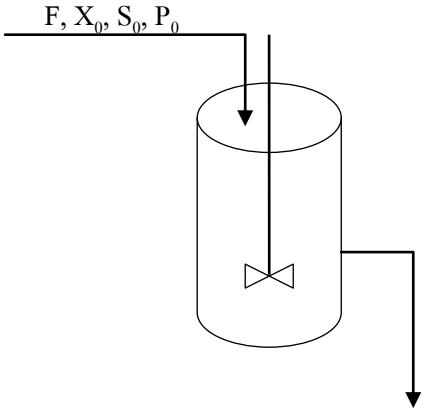
1. ค่าผลได้ตัวทำละลายรวมและค่าผลได้กรดรวม (Yield)

$$Y_{P/S} = \frac{g/L\ Total\ \text{Pr}oducts}{g/L\ Sugar\ utilized} \times 100$$

2. ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายและอัตราการผลิตกรดรวม (productivity)

$$\text{Pr}oductivity = \frac{g/L\ \text{Pr}oducts}{(h)Period\ of\ \ fermentation}$$

3.ค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก



เมื่อ F: เป็นอัตราการไหลเข้า-ออก ของสารละลายอาหาร (กรัมต่อลิตร)

X_0, X : เป็นค่าความเข้มข้นของชีวมวลในสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_0, S : เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

P_0, P : เป็นค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในสารละลายอาหารที่เข้า-ออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

V : เป็นปริมาณของสารละลายในถังหมัก (ลิตร)

สมการสมดุลเชิงชีวมวล

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{FS_0}{V} - \frac{FX}{V} - \alpha X$$

อัตราการสะสมชีวมวล = อัตราการเกิดชีวมวล+ อัตราการไหลของชีวมวลเข้าสู่ถังหมัก - อัตราการไหลของชีวมวลที่ออกจากถังหมัก - อัตราการตายของชีวมวล

เมื่อ μ = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ชั่วโมง$^{-1}$

α = อัตราการตายจำเพาะ (specific death rate) ชั่วโมง$^{-1}$

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง F=0 เนื่องจาก $X_0=P_0=0$ ในสภาวะที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว $\mu >> \alpha$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ } (\mu) = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$

หมายถึง ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียที่ถูกสร้างขึ้นต่อ 1 หน่วยของจุลินทรีย์ ใน 1 หน่วยเวลา (ชั่วโมง)

สมการสมดุลเชิงผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP}{dt} = \nu X + \frac{FP_0}{V} - \frac{FP}{V} - \kappa P$$

อัตราการสะสมผลิตภัณฑ์ = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ + อัตราการไหลของผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่ถังหมัก – อัตราการไหลของน้ำหมัก – อัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์

เมื่อ ν = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific rate of product formation) กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมชีวมวล-ชั่วโมง

κ = อัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ (rate of product destruction) ลิตรต่อชั่วโมง

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง F=0 เนื่องจาก $X_0=P_0=0$ ในสภาวะการสร้างผลิตภัณฑ์ $\nu >> \kappa$

อัตราการการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ν) = $\frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$

หมายถึง ปริมาณกรดหรือตัวทำละลายที่ถูกสร้างขึ้นต่อ 1 กรัมของจุลินทรีย์ใน 1 หน่วยเวลา (ชั่วโมง)

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน

ค.1 ข้อมูลทางการทดลอง

ตารางที่ ค 1.1 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารสูตร 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	62.57	0.09	0.08	0.02	0.24	2.55	1.33
6	56.43	0.10	0.09	0.02	1.87	2.79	1.43
12	50.30	0.42	0.12	0.02	2.90	3.12	4.26
18	39.26	0.46	0.14	0.15	3.23	4.13	6.95
24	31.90	2.25	0.66	0.26	3.19	4.46	6.03
30	20.86	4.69	0.73	0.25	3.18	5.49	5.45
36	19.63	5.20	0.99	0.26	3.27	5.73	5.08
42	10.43	4.86	1.03	0.27	3.64	5.95	5.05
48	8.59	4.83	1.20	0.29	4.35	5.50	3.71
54	7.36	4.63	1.43	0.33	4.71	5.87	3.68
60	6.75	4.58	1.38	0.38	5.01	3.61	3.46
66	2.45	4.41	1.31	0.38	5.53	3.82	3.51
72	0.00	4.33	1.26	0.46	3.18	3.68	3.24
78	0.00	4.39	1.15	0.42	3.18	3.72	3.29
84	0.00	4.34	1.16	0.36	3.24	3.97	3.13
90	0.00	4.25	1.12	0.32	2.99	3.72	2.87
96	0.00	4.30	1.11	0.30	2.99	3.67	2.65

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.2 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารสูตร 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	81.10	0.19	0.25	0.07	0.11	1.12	1.51
6	71.88	0.27	0.33	0.15	0.21	1.22	1.41
12	66.97	0.46	0.36	0.63	0.40	1.86	4.92
18	62.05	0.49	0.49	0.76	0.50	1.99	5.65
24	60.82	0.61	0.56	0.86	0.98	2.35	5.02
30	44.85	1.62	1.25	1.01	2.59	2.56	4.70
36	43.01	2.77	1.69	1.06	3.38	2.95	4.38
42	42.39	3.38	1.74	1.05	2.34	2.78	3.04
48	41.78	6.37	1.87	1.18	2.27	2.19	2.05
54	38.09	6.81	2.08	1.22	1.61	2.10	1.99
60	34.41	7.72	2.33	1.40	1.67	2.18	1.91
66	33.79	7.84	2.53	1.55	1.75	2.14	1.77
72	31.95	8.17	2.72	1.47	1.71	2.15	1.69
78	29.49	8.16	2.80	0.99	1.79	2.11	1.36
84	27.65	8.28	3.25	0.95	1.98	2.10	1.35
90	20.27	8.51	3.51	0.67	1.50	1.65	1.15
96	16.59	8.23	3.04	0.70	1.34	1.57	0.95

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.3 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารสูตร 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	66.07	0.39	0.00	0.03	0.23	2.80	1.48
6	51.27	0.43	0.03	0.15	0.42	3.21	10.35
12	47.48	0.46	0.21	0.26	1.10	3.94	8.82
18	45.49	0.54	0.26	0.43	3.68	5.58	6.07
24	42.97	1.17	0.17	0.54	5.27	6.86	5.98
30	41.52	2.69	0.43	0.65	4.57	6.82	5.18
36	40.62	4.14	1.12	0.81	4.59	7.69	5.23
42	40.44	5.75	1.90	0.83	3.81	7.23	5.34
48	38.45	6.47	2.36	0.87	3.68	7.24	4.87
54	38.63	7.49	2.58	0.81	3.08	6.61	4.86
60	37.55	7.51	2.80	0.82	2.71	6.24	4.84
66	35.38	8.31	3.46	0.82	2.71	6.44	4.54
72	35.38	8.85	3.52	0.83	2.21	5.47	4.39
78	35.56	8.99	3.67	0.85	1.76	4.55	4.36
84	33.40	9.30	3.79	0.89	2.16	5.53	4.33
90	32.86	8.99	3.74	0.93	2.16	5.70	4.09
96	31.41	8.85	3.73	0.92	2.15	5.66	3.29

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.4 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 4259 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารสูตร 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	62.57	0.09	0.08	0.02	0.24	2.55	1.33
6	56.43	0.10	0.09	0.02	1.87	2.79	1.43
12	50.30	0.42	0.12	0.02	2.90	3.12	4.26
18	39.26	0.46	0.14	0.15	3.23	4.13	6.95
24	31.90	2.25	0.66	0.26	3.19	4.46	6.03
30	20.86	4.69	0.73	0.25	3.18	5.49	5.45
36	19.63	5.20	0.99	0.26	3.27	5.73	5.08
42	10.43	4.86	1.03	0.27	3.64	5.95	5.05
48	8.59	4.83	1.20	0.29	4.35	5.50	3.71
54	7.36	4.63	1.43	0.33	4.71	5.87	3.68
60	6.75	4.58	1.38	0.38	5.01	3.61	3.46
66	2.45	4.41	1.31	0.38	5.53	3.82	3.51
72	0.00	4.33	1.26	0.46	3.18	3.68	3.24
78	0.00	4.39	1.15	0.42	3.18	3.72	3.29
84	0.00	4.34	1.16	0.36	3.24	3.97	3.13
90	0.00	4.34	1.16	0.36	3.24	3.97	3.13
96	0.00	4.25	1.12	0.32	2.99	3.72	2.87

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.5 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	61.28	0.19	0.13	0.10	2.17	0.79	0.25
6	59.74	0.41	0.21	0.14	2.49	0.59	0.42
12	56.68	1.48	0.60	0.17	2.68	0.39	0.54
18	55.15	2.06	1.04	0.20	2.04	0.22	0.71
24	55.15	2.80	1.10	0.25	1.68	0.18	0.93
30	42.89	3.19	1.44	0.27	1.60	0.20	1.42
36	38.30	3.57	1.49	0.28	1.45	0.30	1.76
42	38.30	3.60	1.52	0.30	1.41	0.31	1.77
48	38.30	5.08	2.19	0.35	1.36	0.33	1.77
54	22.98	6.39	2.73	0.37	1.39	0.30	2.02
60	15.32	7.57	3.28	0.39	1.49	0.28	2.57
66	15.32	9.41	4.85	0.40	1.93	0.33	2.67
72	15.32	9.42	5.10	0.47	2.46	0.43	2.91
78	12.26	9.98	5.34	0.43	2.23	0.41	2.77
84	10.72	11.11	5.91	0.37	1.95	0.36	2.54
90	10.72	9.78	5.51	0.38	1.69	0.30	2.47
96	3.06	8.73	4.82	0.37	1.63	0.21	2.12

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.6 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 1

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	78.85	0.02	0.00	0.17	0.90	0.46	0.39
6	60.98	0.03	0.00	0.32	1.03	0.47	0.50
12	52.11	0.04	0.00	0.28	1.13	0.47	0.45
18	50.61	0.04	0.00	0.19	2.02	0.62	0.50
24	47.86	0.55	0.00	0.20	1.75	0.74	0.69
30	41.24	0.87	0.00	0.24	1.02	0.89	0.68
36	38.49	1.03	0.35	0.25	1.44	0.93	0.77
42	35.36	1.35	0.92	0.27	1.61	1.36	1.57
48	34.36	3.87	1.94	0.30	1.84	1.29	1.77
54	20.99	7.48	3.00	0.31	2.21	1.22	3.02
60	17.74	7.99	3.27	0.37	2.48	1.26	3.19
66	17.49	8.88	3.35	0.41	2.80	1.28	3.23
72	14.62	9.17	3.45	0.42	2.64	1.29	3.32
78	13.87	9.38	3.53	0.44	2.53	1.31	4.80
84	13.37	9.50	3.49	0.49	2.64	1.20	5.65
90	10.87	9.58	3.32	0.38	2.46	1.07	5.83
96	10.62	9.34	3.27	0.38	2.95	1.39	6.59
102	10.50	9.57	3.19	0.37	3.56	1.79	5.32
108	9.50	9.68	3.27	0.41	3.05	1.46	4.75
114	7.75	10.19	3.62	0.45	2.86	1.32	4.68
120	7.75	10.39	3.70	0.45	2.73	1.29	4.35
126	4.75	11.96	4.39	0.44	2.32	1.13	4.33
132	3.25	9.97	3.87	0.39	2.70	1.10	4.19
138	2.37	9.00	3.63	0.37	2.66	1.08	3.99

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.7 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 2

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	63.95	0.10	0.43	0.00	0.42	1.24	1.60
6	55.48	0.16	0.51	0.14	0.95	1.41	1.96
12	53.17	0.22	0.60	0.21	1.49	1.61	2.16
18	46.23	0.28	0.74	0.24	2.91	2.12	2.20
24	40.84	2.40	2.54	0.33	3.68	1.96	2.24
30	39.30	2.90	4.02	0.34	3.69	2.16	2.68
36	37.76	5.46	4.24	0.35	4.00	2.31	3.10
42	32.36	6.43	4.25	0.36	4.14	2.73	3.32
48	30.05	6.78	4.31	0.35	4.50	3.19	3.92
54	25.43	7.97	4.59	0.38	4.38	3.22	3.18
60	25.43	8.04	4.67	0.37	4.13	3.10	2.98
66	19.26	8.66	4.49	0.41	3.32	2.65	2.72
72	16.18	9.43	4.70	0.44	3.56	2.16	2.40
78	15.41	10.67	4.93	0.46	2.69	2.32	2.36
84	10.02	9.74	4.57	0.40	2.60	2.12	2.06
90	1.54	9.00	4.41	0.38	2.56	1.95	2.00
96	1.54	8.83	4.30	0.37	2.46	1.94	1.92

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.8 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 3

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	60.87	0.05	0.11	0.02	0.58	2.87	1.16
6	56.25	0.12	0.15	0.04	0.89	2.58	1.04
12	45.46	0.17	0.19	0.07	1.02	2.43	0.88
18	43.92	0.93	0.27	0.10	1.04	2.25	0.74
24	43.15	1.27	0.62	0.13	1.77	3.07	0.52
30	40.84	2.26	1.14	0.18	2.45	4.34	0.70
36	39.30	4.41	1.61	0.17	4.12	5.90	0.82
42	34.67	4.77	2.55	0.23	4.56	6.02	1.10
48	34.67	5.13	2.66	0.23	4.66	5.80	1.94
54	28.51	5.68	2.78	0.25	4.55	5.71	1.64
60	22.35	6.39	2.97	0.25	4.80	6.13	1.42
66	20.03	7.27	3.45	0.26	4.84	6.31	1.34
72	13.87	7.02	3.64	0.35	5.52	6.38	1.26
78	13.10	6.78	3.43	0.35	5.52	5.54	1.04
84	11.56	6.64	3.38	0.31	5.51	5.76	0.72
90	10.02	6.64	3.33	0.31	5.04	5.52	0.62
96	9.25	6.51	3.33	0.31	4.90	5.50	0.58

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.9 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 4

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	61.64	0.33	0.09	0.03	0.56	2.87	2.09
6	60.10	0.37	0.09	0.04	0.64	2.51	3.16
12	58.56	0.43	0.10	0.05	0.67	2.38	3.72
18	49.31	0.52	0.11	0.05	1.02	2.25	4.20
24	46.23	0.70	0.11	0.06	1.73	3.07	5.31
30	40.07	0.98	0.20	0.12	2.39	4.34	4.95
36	36.99	1.53	0.36	0.14	4.02	5.54	4.61
42	35.44	2.53	0.76	0.18	4.45	5.90	3.36
48	33.13	3.44	0.76	0.17	3.45	5.33	3.00
54	32.36	4.18	0.82	0.19	3.54	4.86	2.49
60	30.05	4.64	1.15	0.24	3.78	4.89	2.07
66	24.66	4.89	1.14	0.25	3.81	4.98	2.01
72	27.74	5.25	1.20	0.23	4.35	5.13	1.93
78	26.20	5.27	1.17	0.22	4.35	5.19	1.47
84	21.57	4.97	1.22	0.20	4.34	5.17	1.27
90	20.80	4.89	1.19	0.19	4.26	5.13	1.13
96	20.80	4.85	1.09	0.20	4.15	5.08	0.72

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.10 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 5

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	61.14	1.28	0.41	0.07	0.23	3.39	0.38
6	38.47	1.28	0.46	0.38	0.19	3.51	0.53
12	37.79	1.60	0.51	0.04	0.22	3.50	0.47
18	27.48	1.12	0.39	0.17	0.17	3.29	0.39
24	26.11	0.97	0.36	0.18	0.08	3.57	0.52
30	19.92	1.37	0.48	0.19	0.87	2.96	0.54
36	16.49	1.97	0.95	0.19	0.98	2.42	0.54
42	15.80	3.65	1.40	0.20	1.08	1.89	0.55
48	15.11	4.32	1.56	0.20	0.90	1.80	0.59
54	11.68	6.51	2.10	0.26	1.09	1.41	0.82
60	8.24	7.35	2.24	0.49	1.10	1.23	1.36
66	7.56	8.80	2.63	0.61	1.12	1.33	2.46
72	6.87	9.36	2.85	0.33	0.84	1.25	2.74
78	6.18	15.24	4.84	0.30	0.62	1.46	3.01
84	2.75	15.83	5.08	0.25	0.82	1.20	2.99
90	2.06	13.90	4.43	0.29	0.63	1.02	2.97
96	1.37	11.63	3.55	0.19	1.15	1.37	2.93

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.11 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 6

เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	63.18	0.00	0.00	0.00	1.58	1.29	0.09
6	58.56	0.00	0.00	0.10	2.01	1.28	0.09
12	43.15	0.02	0.00	0.25	0.43	1.27	0.10
18	32.36	0.03	0.05	0.24	0.48	2.69	0.17
24	33.13	0.03	0.06	0.21	0.55	2.53	0.22
30	28.51	0.65	0.07	0.22	0.51	2.50	0.28
36	27.74	0.72	0.11	0.23	0.57	2.06	0.35
42	24.66	0.72	0.14	0.22	1.95	2.04	0.40
48	23.89	1.68	0.16	0.24	2.54	1.69	1.48
54	22.35	3.00	1.70	0.23	4.23	1.38	4.76
60	21.57	4.63	2.16	0.23	3.99	1.28	3.66
66	21.57	5.47	2.37	0.23	3.68	1.07	3.52
72	20.80	6.32	2.54	0.46	4.16	0.97	2.48
78	20.80	6.80	3.08	0.51	3.78	1.34	2.45
84	16.18	7.62	3.21	0.53	3.98	1.56	2.24
90	7.71	8.72	3.35	0.52	5.08	1.49	2.07
96	7.71	8.16	3.29	0.50	5.02	1.44	1.78

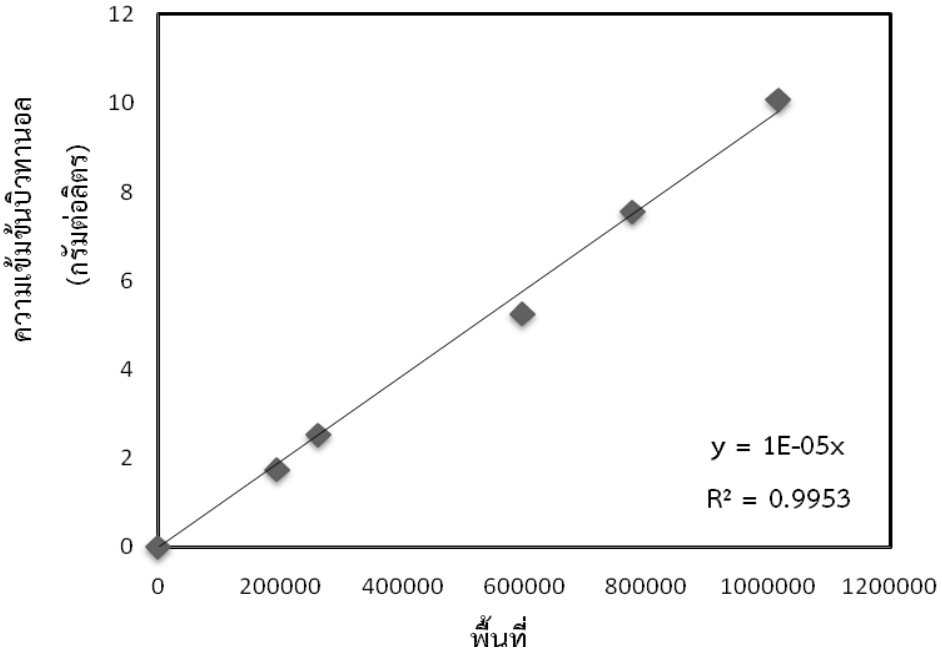
หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ค 1.12 ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาล และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. saccharobutylicum* ATCC BAA 117 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 เมื่อใช้ สูตรอาหารที่ 7

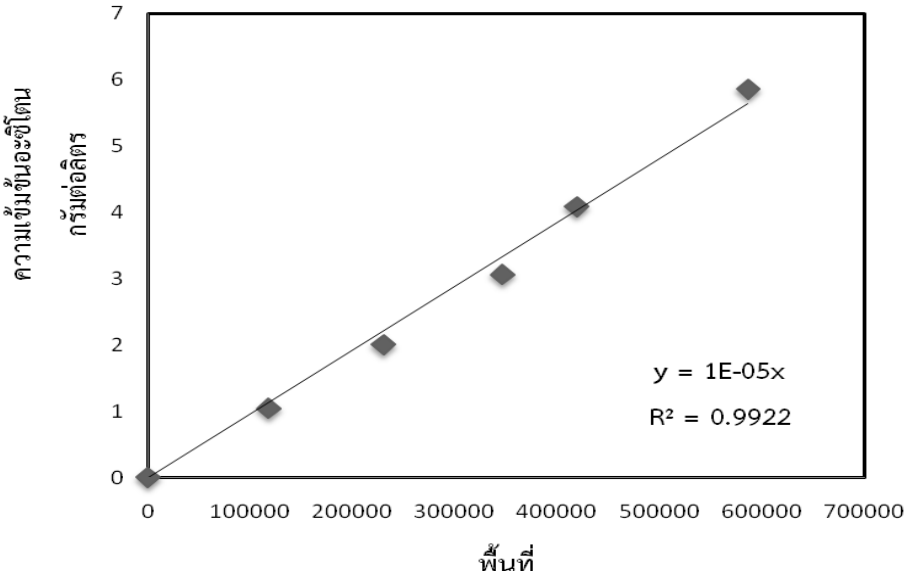
เวลา (ชม.)	น้ำตาลรีดิวซ์	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติก	ความเข้มข้นเซลล์
0	62.52	0.34	0.12	0.04	0.75	1.67	0.01
6	61.14	0.35	0.12	0.05	0.63	1.46	0.01
12	59.08	0.46	0.13	0.06	0.96	1.39	0.01
18	52.90	0.58	0.14	0.06	1.63	1.31	0.05
24	52.21	0.59	0.14	0.07	2.25	1.78	0.06
30	50.15	1.26	0.26	0.15	3.06	2.52	0.06
36	50.15	2.33	0.47	0.16	3.51	2.72	0.10
42	47.40	3.07	0.98	0.21	3.25	3.43	0.11
48	43.97	4.43	0.99	0.21	3.34	3.10	0.41
54	43.28	5.37	1.07	0.23	3.56	2.83	1.49
60	43.28	5.61	1.34	0.28	3.59	3.05	1.27
66	41.22	6.29	1.49	0.30	4.09	2.90	1.15
72	39.85	6.75	1.56	0.28	3.89	2.98	0.69
78	37.79	6.63	1.52	0.28	3.28	2.72	0.68
84	37.79	6.42	1.58	0.24	3.45	2.61	0.65
90	37.10	6.30	1.55	0.23	3.42	2.48	0.59
96	35.72	6.28	1.42	0.24	3.48	2.56	0.59

หมายเหตุ ความเข้มข้นของน้ำตาล และผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

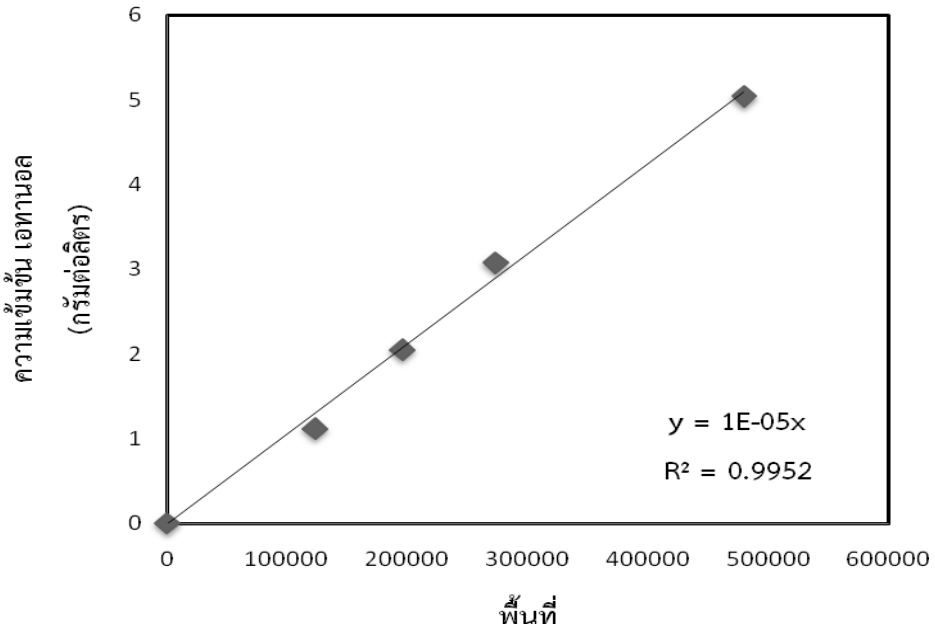
ค.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



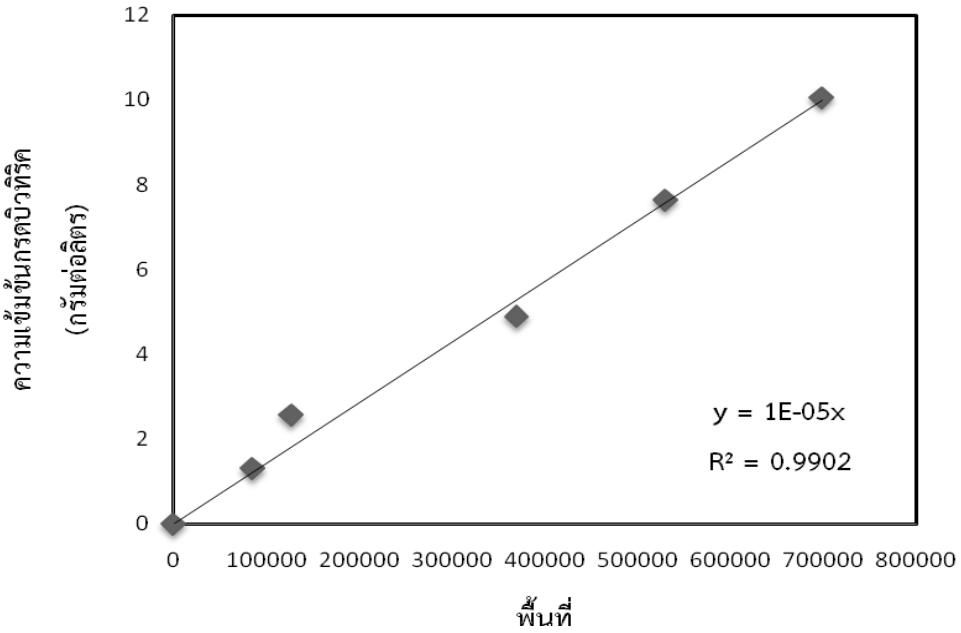
รูปที่ ค.21 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นบิวทานอล



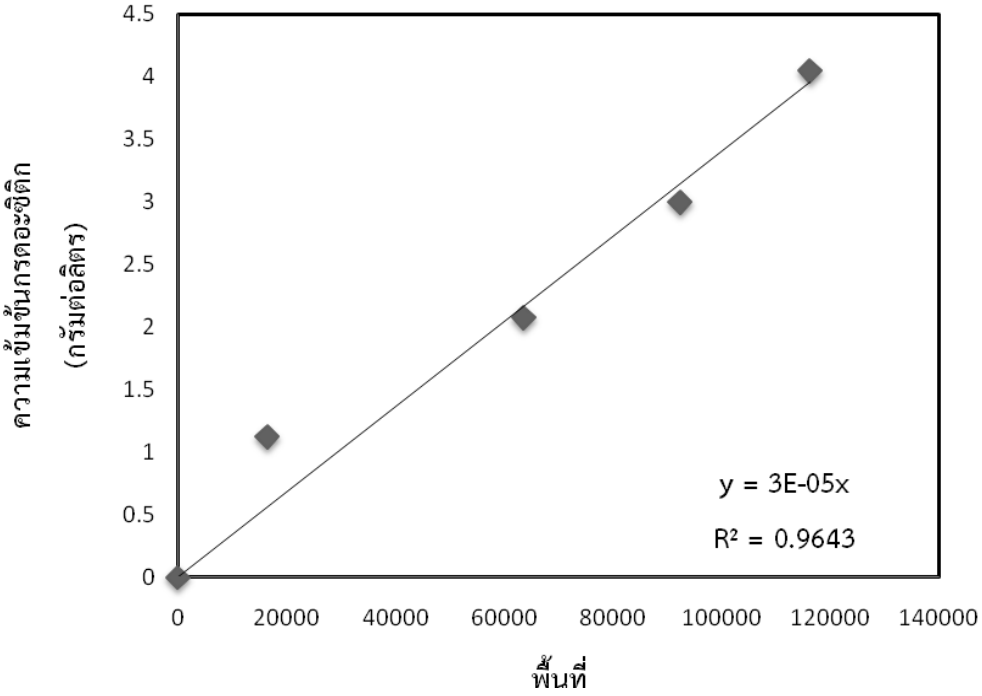
รูปที่ ค 2.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นอะซิโตน



รูปที่ ค 2.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นเอทานอล



รูปที่ ค 2.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดบิวทิริค



รูปที่ ค 2.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดอะซิติก

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายภาณุพงศ์ ทองขาว เกิดเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ. 2531 ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนบ้านนาสาร จังหวัดสุราษฎร์ธานี เมื่อปี พ.ศ. 2549 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา เมื่อปี พ.ศ. 2553 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2554

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

1. P. ThongKhaw and C. Satirapipathkul. EFFECT 0F NITROGEN SOURCE ON ACETONE-BUTANOL-ETHANOL PRODUCTION. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology. วันที่ 4-6 ตุลาคม 2555 ณ โรงแรมโฆษะ จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย

2. P. ThongKhaw and C. Satirapipathkul. IMPROVEMENT IN ABE PRODUCTION FROM SUGARCANE JUICE BY NITROGEN SUPPLEMENTATION. The 5th AUN/SEED-Net Regional Conference on Chemical Engineering. วันที่ 7-8 กุมภาพันธ์ 2556 ณ โรงแรมไซน์พัทยา จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย