การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ

นางสาว อังคณา สุจริต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BUTANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE JUICE BY *CLOSTRIDIUM SPP.* IN BATCH FERMENTATION

Miss Angkhana Sutcharit

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียม ในกระบวนการหมักแบบกะ
โดย	นางสาว อังคณา สุจริต
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(รองศาตราจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล)

……. กรรมการ
(รองศาตราจารย์ ดร. จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์)

……. กรรมการ
(รองศาตราจารย์ ดร. อาทิวรรณ โชติพฤกษ์)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. วรกันต์ บูรพาธนะ)

อังคณา สุจริต : การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ. (BUTANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE JUICE BY *CLOSTRIDIUM SPP.* IN BATCH FERMENTATION) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล.120 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตบิวทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ ด้วยแบคทีเรียกลุ่มคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ เมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบผลกับการใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส พบว่า การใช้น้ำอ้อยสามารถผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด โดยปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการหมัก คือ ชนิดของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ค่าความเป็นกรดด่าง แหล่งและความเข้มข้นข้นของคาร์บอนและไนโตรเจน เมื่อใช้ *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 หมักสารอาหารน้ำอ้อยแบบกะ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด คือที่ 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 สามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้ 24.73 กรัมต่อลิตร (ประกอบด้วย บิวทานอล 15.35 กรัมต่อลิตร, อะซิโตน 4.58 กรัมต่อลิตร และเอทานอล 4.80 กรัมต่อลิตร) ค่าผลได้ตัวทำละลายรวม (Yp/s) เท่ากับ 32.67เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการผลิตตัวทำละลายเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2553.....

5170650921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING
KEYWORDS : BUTANOL / SUGARCANE JUICE / CLOSTRIDIUM / FERMENTATION

ANGKHANA SUTCHARIT: BUTANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE JUICE BY *CLOSTRIDIUM SPP.* IN BATCH FERMENTATION. THESIS ADVISOR: CHUTIMON SATIRAPIPATHKUL, Ph.D. 120 pp.

Butanol production from sugarcane juice by Clostridium spp. bacteria was studied in batch fermentation. In a comparative study of fermentation performance between using glucose medium, sucrose medium and sugarcane juice medium, the maximum total solvent concentrations were obtained from the system using sugarcane juice medium. Microbial strain, pH, sources and concentrations of carbon and nitrogen were important factors affecting the fermentation. By batch fermentation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using the sugarcane juice medium at the optimal initial sugar concentration (80 g/L) at 35 °C and pH 5.0, the total solvents of 24.73 g/L (composed of 15.35 g/L butanol, 4.58 g/L acetone and 4.80 g/L ethanol) with the conversion yield (Yp/s) of 32.67% and 0.26 g/(L•h) production rate was obtained.

Department : Chemical Engineering Student's Signature .....
Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature .....
Academic Year : 2010 .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ การผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อคลอสตริเดียมในกระบวนการหมักแบบกะ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์ ช่วยเหลือที่ดีจากบุคคลต่างๆ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อ.ดร.ชุติมณฑน์ สถิรพิพัฒน์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการวิจัย และให้ข้อคิดเห็นในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขและเพิ่มเติมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จเป็นรูปเล่ม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รศ.ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ รศ.ดร.อาทิวรรณ โชติพฤกษ์ และ ดร.วรกันต์ บูรพาธนะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) ที่ได้กรุณาสนับสนุนทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิศวกรรมเคมี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ตลอดจนเพื่อน พี่และน้องๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว และท่านผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 4

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... 4

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 ประวัติการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE fermentation)..... 6

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก..... 7

2.3 กระบวนการทางชีวเคมีของกระบวนการหมัก..... 8

2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล..... 10

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก..... 11

2.5.1 วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก..... 11

2.5.2 วิตามินและแร่ธาตุ..... 11

2.5.3 ความเข้มข้นของน้ำตาล..... 13

2.5.4 อุณหภูมิในการหมัก..... 16

2.5.5 ค่าความเป็นกรดด่าง..... 16

2.5.6 การทำ Heat shock..... 17

2.5.7 การยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ (Product Inhibition)..... 17

2.5.9 อิทธิพลของการกวน..... 18

2.6 การใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์..... 18

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	21
3.1 อุปกรณ์	21
3.2 เคมีภัณฑ์	21
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก	22
3.4 กระบวนการหมัก (The Fermentation Process)	22
3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก	22
3.4.2 กระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 1 ลิตร	23
3.5 การศึกษาผลของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตบิวทานอล	23
3.6 การศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการผลิตบิวทานอล	23
3.7 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวบิวทานอล	24
3.8 การศึกษาผลของสูตรสารอาหารต่อการผลิตบิวทานอล	24
3.9 การศึกษาผลของความเข้นข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอล	24
3.10 การศึกษาการศึกษาการใช้มันสำปะหลังสดเปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตตัวทำละลาย	24
3.11 การวิเคราะห์ปริมาณ บิวทานอล อาซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทีริค	24
3.12 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	25
3.13 การหาความเข้มข้นของเซลล์	25
3.14 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล	25
4 ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง	26
4.1 ผลการศึกษาผลของชนิดวัตถุดิบต่อการผลิตบิวทานอล	26
4.2 ผลการศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการผลิตบิวทานอล	39
4.3 ผลการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตบิวทานอล	49
4.4 ผลการศึกษาผลของสูตรสารอาหารต่อการผลิตบิวทานอล	61
4.5 ผลการศึกษาผลของความเข้นข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอล	69
4.6 การศึกษาการใช้มันสำปะหลังสดเปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตตัวทำละลาย	81

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	83
5.1 สรุปผลการวิจัย	83
5.2 ข้อเสนอแนะ	87
รายการอ้างอิง	88
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก สูตรสารอาหารในการหมัก	94
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง	95
ภาคผนวก ค การคำนวณ	98
ภาคผนวก ง ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน	100
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณและราคาการนำเข้าน้ำมันดิบในปี พ.ศ. 2548-2552.....	1
1.2	คุณสมบัติของบิวทานอล……..	2
1.3	คุณสมบัติของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ	3
2.1	ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก *C. acetobutylicum*……	10
2.2	วัตถุดิบชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล.....	14
2.3	อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตตัวทำละลาย.....	16
2.4	ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับกระบวนการหมักบิวทานอลแบบกะ (Batch)……	20
4.1	ผลของชนิดวัตถุดิบต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก.....	38
4.2	ผลของชนิดสายพันธุ์เชื้อคลอสตริเดียมต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก.....	48
4.3	ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก……	60
4.4	ผลของสูตรอาหารต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก.....	68
4.5	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก..	80
4.6	ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำอ้อยและมันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวทำละลาย……	82
5.1	การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ของเชื้อ C.acetobutylicum ATCC 824 เมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน…….	86
ก.	สารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย……	94
ข1.1	การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0-250 กรัมต่อลิตร	96
ง1.1	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	100
ง1.2	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกลูโคสที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824.....	101
ง1.3	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824…….	102
ง1.4	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. butylicum* TISTR 1032……..	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง1.5	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย.....	104
ง1.6	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5.....	105
ง1.7	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0.....	106
ง1.8	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ไม่ค่าความเป็นกรดด่าง.....	107
ง1.9	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 45 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารสูตรที่ 2.....	108
ง1.10	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารสูตรที่ 2.....	109
ง1.11	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารสูตรที่ 2.....	110
ง1.12	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 90 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารสูตรที่ 2.....	111

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ชีวเคมีการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายโดย *C. acetobutylicum*	9
4.1	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1……	30
4.2	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1……..	31
4.3	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ในอาหารสูตรที่ 1..	32
4.4	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ในอาหารสูตรที่ 1……....	33
4.5	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ในอาหารสูตรที่ 1..	34
4.6	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ในอาหารสูตรที่ 1……....	35
4.7	ผลของชนิดวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1……..	36
4.8	ผลของชนิดวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1…...	36
4.9	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักเมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน.....	37
4.10	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 โดยเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032…….....	42
4.11	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 โดยเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032……..	43
4.12	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 โดยคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย.....	44
4.13	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 โดยคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย.....	45
4.14	ผลของชนิดสายพันธุ์คลอสตริเดียมต่อการผลิตตัวทำละลายโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1.....	46
4.15	ผลของชนิดสายพันธุ์คลอสตริเดียมต่อการผลิตกรดโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1.....	46
4.16	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก โดยเชื้อคลอสตริเดียม สายพันธุ์ต่างๆ …….	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.17	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5.....	52
4.18	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5.....	53
4.19	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0.....	54
4.20	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0.....	55
4.21	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง.....	56
4.22	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง.....	57
4.23	ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวทำละลายโดยใช้น้ำอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1.....	58
4.24	ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรด โดยใช้น้ำอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1.....	58
4.25	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ.....	59
4.26	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร.....	64
4.27	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร.....	65
4.28	ผลของสูตรอาหารต่อการผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาล รีดิวซ์ เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร.....	66
4.29	ผลของสูตรอาหารต่อการผลิตกรดจากน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร.....	66
4.30	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักจากอาหารสูตรต่างๆ.....	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.31	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร.....	72
4.32	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร.....	73
4.33	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร.....	74
4.34	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร.....	75
4.35	ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร.....	76
4.36	ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร.....	77
4.37	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2.....	78
4.38	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตกรดจากน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2.....	78
4.39	การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ของน้ำอ้อยต่างๆ.....	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากปริมาณสำรองปิโตรเลียมที่พิสูจน์แล้วของประเทศไทย ณ สิ้นปี 2551 มีปริมาณน้ำมันดิบเท่ากับ 182.91 ล้านบาร์เรล และก๊าซธรรมชาติ 12.0 ล้านล้านลูกบาศก์ฟุต โดยปริมาณการผลิตน้ำมันดิบและก๊าซธรรมชาติของประเทศไทยในปี 2551 เท่ากับ 53.15 ล้านบาร์เรล และ 970,244 ล้านลูกบาศก์ฟุต ตามลำดับ เมื่อคิดระยะเวลาที่มีปิโตรเลียมในประเทศให้ใช้ได้ พบว่าแหล่งน้ำมันดิบในประเทศ มีเหลือให้ใช้ได้อีกเพียง 3.4 ปี ส่วนก๊าซธรรมชาติมีเหลือให้ใช้ได้ 12.4 ปีเท่านั้น [1] ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยก็เป็นประเทศที่มีปริมาณน้ำดิบภายในประเทศไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้อยู่แล้ว ต้องนำเข้าน้ำมันดิบมากกว่า 70 เปอร์เซ็น โดยปริมาณน้ำมันดิบที่นำเข้านั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งจะเห็นได้จากรายงานของศูนย์พยากรณ์และสารสนเทศพลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน ที่พบว่า ในปี 2552 มีการนำเข้าปริมาณน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นจากปี 2551 ถึง 7.6 เปอร์เซ็นต์ [2] และจากราคาน้ำดิบที่มีการผันผวนตลอดเวลาอาจส่งผลต่อเศรษฐกิจและการพัฒนาอุตสาหกรรมของประเทศได้ จึงต้องมีการแสวงหาพลังงานทดแทนในรูปแบบอื่น เพื่อใช้ทดแทนหรือลดปริมาณการใช้น้ำมันปิโตรเลียมลง

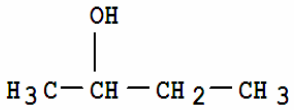
พลังงานชีวมวลเป็นพลังงานชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากผลิตได้จากผลิตผลทางการเกษตรซึ่งสามารถผลิตใหม่ทดแทนได้ โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีผลผลิตทางการเกษตรหรือวัสดุหรือทิ้งจากการเกษตรจำนวนมาก ที่สามารถนำมาเปลี่ยนเป็นสารที่ให้พลังงานได้ เช่น เอทานอล บิวทานอล เป็นต้น

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและราคาการนำเข้าน้ำมันดิบในปี พ.ศ. 2548-2552 [2]

	2548	2549	2550	2551	2552	อัตราการเปลี่ยนแปลง (เปอร์เซ็นต์)		
						2550	2551	2552
ปริมาณ (ล้านบาร์เรลต่อวัน)	828	829	804	812	874	-3.0	0.9	7.6
ราคาเฉลี่ย ($ US ต่อ บาร์เรล)	53.88	65.41	70.54	101.44	57.54	7.8	43.5	-48.5
มูลค่า (ล้านล้านบาท)	645	754	716	1003	620	-5.0	40.1	38.2

บิวทานอลเป็นพลังงานจากชีวมวลชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากผลผลิตหรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยบิวทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนสี่อะตอมต่อกัน มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นเชื้อเพลิงในหลายๆ ด้าน จากตารางที่ 1.2 และ 1.3 จะเห็นว่า การที่บิวทานอลเป็นคาร์บอนสี่อะตอมต่อกัน เมื่อเกิดการเผาไหม้จะให้พลังงาน (29.2 เมกะจูลต์ต่อลิตร) มากกว่าเอทานอลซึ่งมีคาร์บอนสองอะตอม (19.6 เมกะจูลต์ต่อลิตร) และมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมันเบนซิน (32 เมกะจูลต์ต่อลิตร) สามารถใช้ในเครื่องยนต์เบนซินได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีการปรับปรุงเครื่องยนต์ เมื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์สันดาปภายในจะเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์ไม่เกิดแก๊สพิษ ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้บิวทานอลยังมีค่าความดันไอและการกัดกร่อนน้อยกว่าเอทานอลทำให้สามารถขนส่งได้สะดวกและปลอดภัยกว่า [3] สามารถละลายได้ดีในน้ำมันเบนซินและดีเซล ไม่ก่อให้เกิดการแยกชั้น

ตารางที่ 1.2 คุณสมบัติของบิวทานอล [3]

คุณสมบัติ	บิวทานอล
สูตรโครงสร้าง	
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	-89.3
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	117.7
อุณหภูมิการลุกไหม้ (องศาเซลเซียส)	35
จุดวาบไฟ (องศาเซลเซียส)	365
ความหนาแน่น ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (กรัมต่อมิลลิลิตร)	0.8098
ความดันวิกฤต (กิโลปาสคาล)	48.4
อุณหภูมิวิกฤต (องศาเซลเซียส)	287

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม จึงมีวัตถุดิบที่จะใช้ในการผลิตบิวทานอลได้หลายชนิด รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและวัชพืช เช่น แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังสด ผักตบชวา ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย และน้ำอ้อย เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีราคาถูก หาง่าย และมีปริมาณมากภายในประเทศ แต่วัตถุดิบที่น่าสนใจมากที่สุด คือน้ำอ้อย ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ต้องผ่านการแปรรูป สามารถนำมาใช้หมักได้โดยตรง และประเทศไทยสามารถปลูกอ้อยได้ในปริมาณมากในแต่ละปี ทำให้ไม่ต้องกังวลในเรื่องของการขาดแคลนวัตถุดิบในการหมัก แต่เนื่องจากกระบวนการหมักน้ำอ้อยยังไม่ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการหมักที่แน่นอน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยกระบวนการหมักแบบกะ

ตารางที่ 1.3 คุณสมบัติของเชื้อเพลิงชนิดต่างๆ [3]

Properties	บิวทานอล	น้ำมันเบนซิน	เอทานอล	เมทานอล
Energy density (MJ/kg)	29.2	32	19.6	16
Air-fuel ratio	11.2	14.6	9	6.5
Heat of vaporization (MJ/kg)	0.43	0.36	0.92	1.2
Research octane number	96	91-99	129	136
Motor octane number	78	81-89	102	104

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มคลอสตริเดียม ในกระบวนการหมักแบบกะ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาผลของวัตถุดิบต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลของเชื้อ *C.acetobutylicum* ATCC 824 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์

2. ศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอ โดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในถังหมักขนาด 1 ลิตร เปรียบเทียบระหว่าง *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* TISTR 1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

3. ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างะหว่างการหมักที่ ไม่ควบคุม, 4.5, 5.0 และ 5.5

4. ทำการทดสอบการเจริญเติบโตและการผลิตบิวทานอลโดยการปรับปรุงสูตรสารอาหารที่ใช้ในการหมัก เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอล

5. ศึกษาอิทธิพลของความเข้นข้นน้ำอ้อยต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล โดยใช้ความเข้มข้นน้ำอ้อย 45, 60, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในถังหมักขนาด 1 ลิตร

6. วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ของระบบ ได้แก่

- ค่าผลิตภัณฑ์จำเพาะ
- อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์
- ผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์

7. วิเคราะห์ผลการทดลองทั้งหมด สรุปสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักน้ำอ้อยแบบกะ ในถังหมักขนาด 1 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลจากน้ำอ้อยโดยเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์คลอสตริเดียมในระดับถังหมักแบบกะ 1 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนากระบวนการหมักบิวทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บิวทานอลสามารถผลิตได้จากทั้งกระบวนการทางปิโตรเคมี และจากกระบวนการทางชีวภาพโดยการหมัก ซึ่งในปัจจุบันการผลิตบิวทานอลจากปิโตรเคมีมีต้นทุนที่สูงขึ้น เนื่องจากความผันผวนของราคาด้านพลังงาน ในขณะที่การผลิตโดยกระบวนการหมักที่สามารถผลิตได้จากวัสดุชีวภาพ ทำให้สามารถผลิตพลังงานได้อย่างต่อเนื่องและยั่งยืนได้ นอกจากนี้ยังเป็นพลังงานสะอาดและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แม้ว่าบิวทานอลจะมีสมบัติเป็นเชื้อเพลิงที่ดี แต่ปัจจุบันยังไม่มีการนำบิวทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทน เนื่องจากต้นทุนการผลิตบิวทานอลจากการหมักยังมีราคาสูง ซึ่งเกิดจากปัจจัยที่สำคัญ คือ กระบวนการหมักยังมีอัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ค่อนข้างต่ำประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างเจือจางในน้ำหมัก จึงมีความพยายามที่จะปรับปรุงกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.1 ประวัติการหมักอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE fermentation)

การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักได้มีการศึกษามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1862 หลังจาก Pasteur ได้ค้นพบแบคทีเรียที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1912 Dr. Weizman สามารถแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิต อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล ได้สำเร็จ และให้ชื่อว่า *Clostridium acetobutylicum* ซึ่งนับเป็นปีเริ่มต้นการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอลในระดับอุตสาหกรรม [4] ในสมัยสงครามโลกครั้งที่หนึ่ง ได้มีการผลิตอะซิโตนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการทำวัตถุระเบิด ส่วนบิวทานอลได้ถูกเปลี่ยนเป็นบิวตะไดอีน เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิตยางสังเคราะห์ ปี ค.ศ.1930 ได้มีการแยก *Clostridium saccharoacetobutylicum* ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมักได้สำเร็จ ต่อมาในปี ค.ศ. 1945 อุตสาหกรรมการหมักตัวทำละลายถูกแข่งขันจากการผลิตโดยปิโตรเคมี ซึ่ง 66 เปอร์เซนต์ได้จากการสังเคราะห์ และ 10 เปอร์เซนต์ ได้จากการหมัก ต่อมาการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากการหมักได้หยุดชะงักลงช่วงหนึ่ง เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของราคากากน้ำตาลและธัญพืชที่เป็นวัตถุดิบมีราคาสูงขึ้น เมื่อเทียบกับการผลิตจากปิโตรเคมีซึ่งมีราคาถูกกว่า และปัจจุบันราคาน้ำมันดิบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้การผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมัก ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

ในอุตสาหกรรมการผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล จะใช้แบคทีเรียในกลุ่มคลอสตริเดียมเป็นส่วนใหญ่ โดยคลอสตริเดียมที่สามารถผลิตตัวทำละลายได้ เช่น

2.2.1 *Clostridium acetobutylicum* ให้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิโตนต่อบิวทานอลต่อเอทานอลเท่ากับ 6:3:1 (โดยประมาณ) ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมใช้ เช่น *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 [5-7]

2.2.2 *Clostridium beijerinckii* (*C. butylicum*) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นบิวทานอล ไอโซโพรพานอลและเอทานอล ในอัตราส่วน 6:3:1 ที่นิยมใช้ เช่น *Clostridium beijerinckii* BA 101 [6] และ *Clostridium butylicum* NRRL B592 [6] เป็นต้น

2.2.3 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ให้ผลิตภัณฑ์เป็น อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล เช่น สายพันธุ์ *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 เป็นต้น [9]

2.2.4 *Clostridium saccharobutylicum* ให้ผลิตภัณฑ์เป็น บิวทานอล อะซิโตนและเอทานอล

คลอสตริเดียมเป็นแบคทีเรียที่เจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 29-35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5-6.8 สามารถสร้างตัวทำละลาย (solventogenic) ทั้งในอาหารน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตทั้งที่เป็นโมเลกุลเดี่ยวและเป็นโพลิเมอร์ สำหรับแหล่งไนโตรเจนนั้น จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถใช้ไนโตรเจนได้โดยตรงผ่านกระบวนการตรึงไนโตรเจน หรืออยู่ในรูปของแอมโนเนียมอิออน และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ซับซ้อน เช่น สารสกัดยีสต์หรือหางนมเข้มข้น (whey protein concentration) สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ [10]

2.3 กระบวนการทางชีวเคมีของกระบวนการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE fermentation)

การหมักเพื่อผลิตอะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล จะเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน [11]

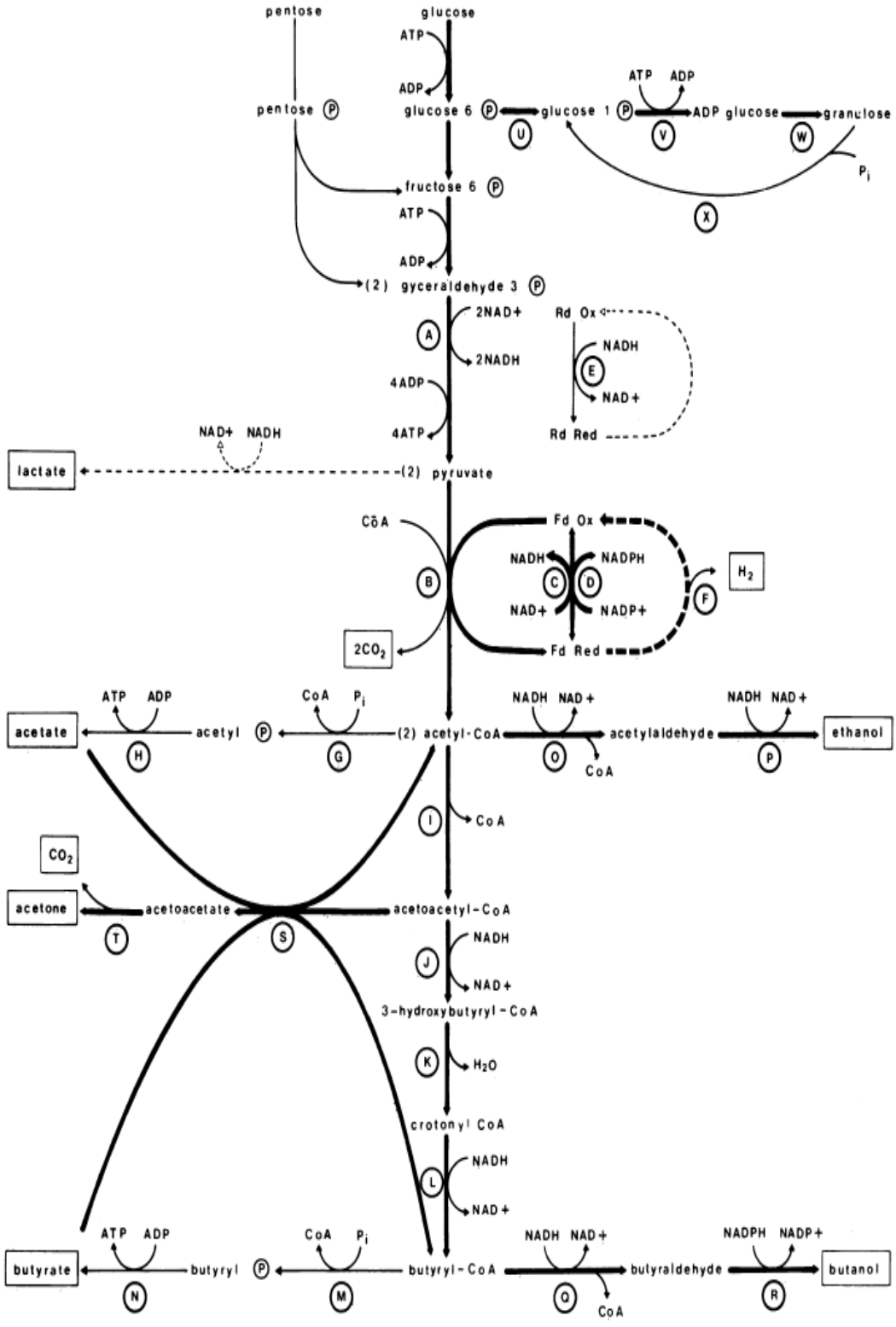
1. ขั้นตอนที่ 1 การสร้างกรดอินทรีย์ (Acidogenesis)

กลูโคสจะถูกเมตาโบไลต์ (Metabolite) ไปเป็นไพรูเวท (Pyruvate) ด้วยกระบวนการเอ็มเดน - เมเยอร์ฮอฟ-พานาส (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) จากนั้นไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นอะซิทติลโคเอ (Acetyl Co-A) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติค (Acetic acid) และบิวไทริลโคเอ (Butyryl CoA) ก่อนเปลี่ยนเป็นกรดบิวทิริค ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดลง ช่วงนี้จะอยู่ในระยะพักตัว (lag phase) และระยะการเพิ่มจำนวน (exponential growth phase) โดยมีผลิตภัณฑ์สำคัญคือ อะซิเตต บิวทิเรต คาร์บอนไดออกไซด์และแก๊สไฮโดรเจน รวมทั้ง อะซิโตน และแลคเตตในปริมาณเล็กน้อย โดยปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นสะสมในน้ำหมัก ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อลดลง เนื่องจากถูกยับยั้งโดยกรดทั้งสอง

2. ขั้นตอนที่ 2 การสร้างตัวทำละลาย (Solventogenesis)

จุดเริ่มต้นของขั้นที่ 2 จะถูกกระตุ้นจากการสะสมความเข้มข้นของกรดทั้ง 2 ชนิด ควบคู่ไปกับการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง (ปกติจะมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.8 ภายใน 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) คลอสตริเดียมจะเปลี่ยนกรดไปเป็นตัวทำละลาย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยใช้แหล่งคาร์บอนและกรดอินทรีย์ไปพร้อมๆ กัน โดยกรดอะซิติคจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิโตน ส่วนบิวไทริลโคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นบิวทานอล และอะซิทิลโคเอจะเปลี่ยนเป็นอะซิทัลดีไฮด์ (Acetyldehyde) และเปลี่ยนเป็นเอทานอล ในขั้นนี้จะทำให้ปริมาณของกรดอินทรีย์ลดลง มีผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนจากขั้นตอนการสร้างกรดเป็นขั้นตอนการสร้างตัวทำละลาย เรียกว่า pH break-point รวมทั้งการสร้างแก๊สไฮโดรเจน จะลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของระยะการสร้างกรด วิถีการหมักแสดงดังรูปที่ 2.1 [9]

มีรายงานว่าปริมาณของกรดอะซิติคและบิวทิริค จากการสร้างหรือการเติมที่ความเข้มข้นของกรดในช่วง 10-20 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณ 2 กรัมต่อลิตร จะเกิดการปรับสภาพจากสภาวะการสร้างกรด (acidogenic) เป็นสภาวะการสร้างตัวทำละลาย (solventogenic) แต่ในบางครั้งพบว่าต้องใช้ถึง 6 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า ในระยะการสร้างตัวทำละลาย จะมีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ (Sporulation) ของจุลินทรีย์ โดยจะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5



รูปที่ 2.1 ชีวเคมีการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายโดย *C. acetobutylicum* [11]

2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก อะซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล (ABE fermentation)

มีรายงานว่า เชื้อคลอสตริเดียมจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้เพียง 32-34 เปอร์เซ็นต์ โดยผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเป็นตัวทำละลายซึ่งสะสมอยู่ในน้ำหมัก 30 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นกรดอินทรีย์ซึ่งมีปริมาณน้อย (กรดอะซิติคและกรดบิวทิริค) และกากที่เหลือจากการหมักซึ่งอุดมด้วยโปรตีนและวิตามิน โดยทั่วไปปริมาณแก๊สจะมากกว่าตัวทำละลายประมาณ 1.5 เท่าโดยน้ำหนัก และอัตราส่วนโดยประมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ต่อไฮโดรเจนเป็น 3:2 และอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ อะซิโตน: บิวทานอล: เอทานอล จะเป็น 3:6:1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก *C. acetobutylicum* [11]

ชนิดผลิตภัณฑ์	โมลต่อโมลของกลูโคสที่ใช้ในการหมัก		
	การหมักทั้งหมด	ขั้นตอนการผลิตกรด	ขั้นตอนการผลิตตัวทำละลาย
แก๊สไฮโดรเจน	1.35	2.5	1.4
แก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์	2.21	2.0	2.3
อะซิเตต	0.14	0.5	-
บิวทิเรต	0.04	0.75	-
อะซิโตน	0.22	-	0.3
บิวทานอล	0.56	-	0.65
เอทานอล	0.07	-	0.1
ATP/ กลูโคส		3.25	2.0
ผลได้ตัวทำละลาย (เปอร์เซ็นต์)	32	-	36.7

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก

2.5.1 วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก

เนื่องจากเชื้อในกลุ่มคลอสตริเดียมเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารน้ำตาลเฮกโซสและเพนโตส ได้หลายชนิด วัตถุดิบที่สามารถผลิตบิวทานอลได้ เช่น กากน้ำตาล หางนม และแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลัง น้ำข้าวฟ่างหวาน [10-12] เป็นต้น รวมทั้งใช้วัสดุเหลือทิ้งที่มีราคาไม่แพง เช่น ของเสียจากโรงงานผลิตแป้ง (starch-based waste) และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ใยและซังขาวโพด ผักตบชวาที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว [6,13] แต่เนื่องจาก คลอสตริเดียมไม่สามารถย่อยวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสได้ จึงต้องใช้การปรับสภาพ (pretreatment) ก่อนนำมาย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น การใช้กรดเจือจาง [14] การใช้น้ำร้อนที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ [15] และการใช้วิธีการย่อยเส้นใยด้วยแอมโมเนีย (ammonia fiber expansion) [16] ซึ่งสามารถย่อยและลดดีกรีพอลิเมอร์ได้ (depolymerize biomass) หลังจากนั้นจึงนำมาย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์ เพื่อให้ได้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ โดยตารางที่ 2.2 แสดงสารตั้งต้นที่สามารถผลิตบิวทานอลได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตบิวทานอลจากสารตั้งต้นอื่นๆ เช่น การใช้กลีเซอลรอลเกรดต่ำ โดยเชื้อ *C. acetobutylium* พบว่าให้ผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.34 โมลต่อโมล และให้อัตราการผลิต 0.42 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง [17] นอกจากนี้ ยังมีการใช้สลัดด์จากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการย่อยสลายและแป้งสาคูโดยเชื้อ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) โดยสลัดด์ที่ผ่านการย่อยสลายสามารถนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและใช้ในการหมัก ซึ่งสามารถผลิตบิวทานอลได้ 3.5 กรัมต่อลิตร [18]

2.5.2 วิตามินและแร่ธาตุ

วิตามินที่ให้แก่คลอสตริเดียมในกระบวนการผลิตตัวทำละลายยังไม่แน่ชัด วิตามินที่จำเป็น ได้แก่ ไบโอติน (Biotin) และพาราอะมิโนเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) โดยปริมาณที่เหมาะสม คือ 0.01 กรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยวิตามินทั้งสองมีอยู่ในยีสต์สกัด [19] ดังนั้น สามารถใช้ยีสต์สกัดแทนวิตามินทั้งสองได้

การใช้สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ซึ่งจะให้กรดอะมิโนที่สำคัญและโกรทแฟคเตอร์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ หรือปริมาณไนโตรเจนจำกัดสำหรับการหมัก (nitrogen-limited) จะมีการผลิตตัวทำละลายมากขึ้น [20] โดยในกระบวนการหมักแบบกะและการหมักแบบต่อเนื่อง พบว่า การผลิตบิวทานอลจะลดลงเมื่ออัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่า 7.3

การใช้หางนมเข้มข้น (whey protein concentration) ที่ประกอบด้วยโปรตีนสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีน้ำตาลแลคโตสเลย สามารถใช้ทดแทนการใช้สารสกัดยีสต์และทริปโทนได้

แม้ว่าการสร้างตัวทำละลายเกิดช้าลง เนื่องจากการมีช่วงปรับสภาพเซลล์ (lag phase) ที่ยาวขึ้น แต่สามารถผลิตบิวทานอลได้ดีกว่า [10] ส่วนในน้ำแป้งข้าวโพด (corn steep water ,CSW) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ได้จากอุตสาหกรรมแป้งข้าวโพด ที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่สำคัญ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน ไนโตรเจน และเกลือแร่ ก็สามารถใช้แทนอาหารเสริมได้ดี (organic-nitrogen-source yeast extract) ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตอะซิโตน-บิวทานอลได้ โดยพบว่า เมื่อใช้กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร หมักร่วมกับสารอาหารน้ำต้มข้าวโพด โดยเชื้อ *C. beijerinckii* BA101 จะได้บิวทานอลเท่ากับ 16 กรัมต่อลิตร (ในถังหมัก 20 ลิตร) และเมื่อขยายสเกลถังหมักเป็น 200 ลิตร และใช้กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร หมักร่วมกับอาหารน้ำต้มข้าวโพด จะผลิตบิวทานอลได้ 17.8 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากน้ำต้มข้าวโพดจากอุตสาหกรรมจะมีส่วนประกอบที่สามารถเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น กรดแลคติค ซัลไฟต์ กรดฟีลิค โลหะหนัก และเกลือของโลหะหนักนี้ ดังนั้นต้องมีการเจือจางก่อนที่จะนำมาใช้สำหรับเป็นแหล่งอาหาร [20]

แมงกานีส มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียม โดยปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะมีอิทธิพลต่อการผลิตบิวทานอล โดยอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นตัวทำละลายลดลง [19]

แมกนีเซียม มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.05-0.2 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิตตัวทำละลาย และการใช้น้ำตาลของคลอสตริเดียมดีที่สุด [19]

เหล็ก มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของคลอสตริเดียม ปริมารเหล็กที่เหมาะสมคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อไม่เติมเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การเจริญเติบโตช้าลง น้ำถูกใช้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายเพียง 25 เปอร์เซ็นต์

โปแตสเซียม มีบทบาทต่อการใช้กลูโคสของเชื้อคลอสตริเดียม ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตกรดมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง [19]

แอมโมเนียมอะซิเตต มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลาย ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 1.1-2.2 กรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้ จะทำให้ผลิตกรดมากขึ้น และผลิตตัวทำละลายน้อยลง [19]

2.5.3 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ในกระบวนการหมักแบบกะ (batch Fermentation) ความเข้มข้นของสารอาหารจะมีผลต่อการผลิตตัวทำละลาย โดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตตัวทำละลายขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ โดยผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสในอาหาร Trypton-Yeast- Ammonium (TYA medium) ต่อการผลิตตัวทำละลายรวม โดยเชื้อคลอสตริเดียมที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น *C. acetobtylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* NCIMB 8825, *C. beijerinckii* NRRL B592, *C. saccharobutylicum* NCP P262 และ *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 พบว่า จะผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด ที่ความเข้มข้นกลูโคสแตกต่างกัน เช่น *C. acetobtylicum* ATCC 824 จะผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด ที่ความเข้มข้นกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร โดยผลิตตัวทำลายรวมได้ 18.5 กรัมต่อลิตร ผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 31.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อลดหรือเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 50 หรือ 70 กรัมต่อลิตร จะผลิตตัวทำละลายรวมได้น้อยลงคือ 15.7 และ 13.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ *C. beijerinckii* NRRL B592 จะผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด 12.7 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เช่นกัน [7]

ตารางที่ 2.2 วัตถุดิบชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์	สภาวะในการหมัก			ผลได้ตัวทำละลาย (เปอร์เซ็นต์)	ตัวทำละลาย (กรัมต่อลิตร)	อะซิโตน: บิวทานอล: เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
		ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง				
Wheat straw hydrolysate	*C. beijerinckii* P260	62	35	6.5	0.41	20.1	6.7:12.7:0.6	[6]
Corn fiber hydrolysate (treated with resin XAD-4)	*C. bejerinckii* BA101	49.3	35	6.8	0.39	9.3	2.7:6.4:0.2	[19]
Starch hydrolysate	*C. bejerinckii* BA101	40.8 (แป้ง)	36±1	-	0.49	20.0	5.4:14.3:0.3	[20]
Sugar cane molasses hydrolysate	*C. acetobutylicum* PTCC-23	60	32±2	6.2	0.34	-	15.2 (บิวทานอล)	[21]
Apple pomace juice hydrolysate	*C. beijerinckii* NRRL B592	43.2	37	6	0.38	14.12	9.18 (บิวทานอล)	[2]
Potato unhydrolysed	*C. acetobutylicum* ATCC 824 *C. beijerinckii* NRRL 592	45-48 (แป้ง)	30	-	-	1.9 9.4	0.7:1.1: 0.1 2.5:6.7: 0.2	[22]

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) วัตถุดิบชิดต่างๆ ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทานอล

วัตถุดิบ	จุลินทรีย์	สภาวะในการหมัก			ผลได้ตัวทำละลาย (เปอร์เซ็นต์)	ตัวทำละลาย (กรัมต่อลิตร)	อะซิโตน : บิวทานอล : เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
		ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรดด่าง				
Wheat straw hydrolysate+glucose	*C. beijerinckii* P260	92.9	35	6.5	42	28.2	-	[23]
Wheat straw hydrolysate+glucose	*C. beijerinckii* P260	128.3	35	6.5	37	47.6	7.3:14.8: 1.2	[23]
Whey	*C. acetobutylicum* P262	60	35	5.0	-	7.72	1.91:5.56:0.25	[8]
Defibered-sweet-potato-slurry (DSPS)	*C. acetobutylicum* P-262	39.7 (แป้ง)	37	6.8	0.29	5.87	1.56:5.52:0.65	[24]
Glucose	*C. acetobutylicum* ATCC 824	60	35	-	0.31	18.5	-	[5]
Glucose	*C. bejerinckii* BA101	55	35	6.8	38	18.1	13.2(บิวทานอล)	[20]

2.5.4 อุณหภูมิในการหมัก

อุณหภูมิในการหมักจะมีผลต่อการผลิตตัวทำละลายรวม และอัตราส่วนของบิวทานอล โดยพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลายของจุลินทรีย์จะอยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส มีรายงานการใช้มันสำปะหลังสด และน้ำตาลที่ได้จาการย่อยสลายผักตบชวาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตบิวทานอล พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักจะอยู่ในช่วงระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. acetobutylicum* ATCC 824 และ *C.beijerinckii* NRRL B592 และเมื่ออุณหภูมิต่ำเกินไป (25 องศาเซลเซียส) หรือสูงขึ้น (40 องศาเซลเซียส) จะให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายลดลง [6] และมีรายงานผลของอุณหภูมิต่อการผลิตปริมาณตัวทำละลาย แสดงไว้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตตัวทำละลาย [27]

อุณหภูมิการหมัก (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ผลได้ ตัวทำละลาย	อัตราส่วนบิวทานอลต่ออะซิโตน
25	29.1	3.48
30	28.4	3.70
37	25.5	4.73
40	24.9	5.67

2.5.6 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดด่างของสารอาหารมีความสำคัญต่อการผลิตบิวทานอลอย่างมาก โดยทั่วไป ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการสร้างตัวทำละลายมักอยู่ในช่วงประมาณ 3.8-5.5 และอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์และสภาวะแวดล้อมที่กำหนด ปกติค่าความเป็นกรดด่างของสารอาหารจะเป็นตัวกำหนดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ที่ค่าสูง จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรด ในขณะที่การควบคุมที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ จะมีผลให้เกิดตัวทำละลายเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยมีรายงานว่า ในขั้นตอนการผลิตตัวทำละลายต้องการค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำแต่ไม่ควรต่ำกว่า 4.5 เนื่องจากเมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่านี้ ก่อนจะมีการผลิตกรดในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการผลิตตัวทำละลายแล้วจะมีผลทำให้การผลิตตัวทำละลายเกิดขึ้นในช่วงสั้นๆ และผลิตได้ไม่มาก ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง จึงเป็นวิธีการง่ายๆ ในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการใช้คาร์โบไฮเดรตเพื่อผลิตบิวทานอล

2.5.7 การทำ Heat shock

การทำ heat shock มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยจะไปเพิ่มความสามารถในการผลิต และความทนทานต่อปริมาณบิวทานอล รวมทั้งมีผลต่อการเพาะเลี้ยง (Sub-culture) ในอาหารรุ่นต่อๆ มา โดยเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ว่องไว ได้มีการศึกษาอิทธิพลของการทำ heat shock [28] ในการหมักโดย *C. beijerinckii* NRRL B592 พบว่าอัตราเหลือรอดของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ มีความสัมพันธ์กัน และปริมาณตัวทำละลายทั้งหมดของการหมักจะแปรผันตามอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ heat shock โดยที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุด เนื่องจากการทำ heat shock จะไปเร่งการเจริญของสปอร์ขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดการผลิตตัวทำละลายสูงขึ้น โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ heat shock จะอยู่ในช่วง 70-80 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยอิทธิพลของการทำ heat shock นั้นยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด

2.5.8 การยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ (Product Inhibition)

เชื้อ *C. acetobutylicum* ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักส่วนใหญ่เป็นบิวทานอล รองลงมา คือ อะซิโตนและเอทานอล ตามลำดับ โดยมีรายงานว่าบิวทานอลมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ [29] โดยทั่วไปเซลล์สามารถทนทานต่อความเข้มข้นของบิวทานอลได้ไม่เกิน 13-15 กรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเนื่องจากบิวทานอล (solvent toxicity) เกิดขึ้นเนื่องจากบิวทานอลจะไปละลายไลโปโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื้อหุ้มเซลล์ ทำให้มีผลต่อความเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์

Linda และคณะ [30] รายงานว่า บิวทานอลมีผลต่อเชื้อ *C. acetobutylicum* สูงมาก โดยที่ความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์และทำลายความสามารถของเซลล์ในการรักษาภาวะความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ให้คงที่ ทำให้ระดับ ATP ลดลง และยับยั้งการใช้น้ำตาลกลูโคส

Grott schall และคณะ [31] รายงานว่า ความเข้มข้นของบิวทานอลในช่วง 7-16 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เซลล์เพิ่มอัตราการย่อยตัวเอง (autolysis) แต่จะไม่มีผลต่อสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการฉายรังสีอุตราไวโอเลตซึ่งเป็นพวกที่บกพร่องในการย่อยตัวเอง (autolysis-deficient mutant) โดยสายพันธุ์กลายเหล่านี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของบิวทานอลสูง

2.5.9 อิทธิพลของการกวน

การศึกษาอิทธิพลของการกวนในถังหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะเพิ่มขึ้นตามอัตราการหมุนใบพัดจาก 190 ถึง 340 รอบต่อนาที อัตราการผลิตจำเพาะสูงสุดของบิวทานอล อะซิโตน และเอทานอล เป็น 5.54, 3.85 และ 0.8 มิลลิโมลต่อชั่วโมง ตามลำดับ และจะมีค่าลดลงเป็นศูนย์เมื่อเพิ่มอัตราการหมุนของใบพัดจนถึง 360 รอบต่อนาที [32]

2.6 การใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์

การใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose utilization) ในกระบวนการหมักที่ใช้กากน้ำตาลหรือวัสดุอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การควบคุมการใช้น้ำตาลชนิดนี้ในตัวเซลล์จึงมีความสำคัญต่อการควบคุมการผลิต ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้น้ำตาล โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 พบว่ามีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวได้ โดยจะมีการสร้างเอนไซม์ซูเครสของระบบ PEP-dependent phosphotransferase system รวมทั้งเอนไซม์ฟลุคโตไคเนส (fructokinase) ในระบบ ATP-dependent phosphorylation ของฟรุคโตส เกิดขึ้นตามช่วงเวลาและเพิ่มขึ้นตามลำดับ ส่วนในอาหารที่มีแต่กลูโคสจะไม่มีการสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีทั้งกลูโคสและซูโครส โดยเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นในอาหารซูโครสก่อน แล้วจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารใหม่ (กลูโคสและซูโครส) พบว่ามีการใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดได้เช่นกัน แต่กลูโคสจะถูกใช้ก่อน เมื่อกลูโคสหมดเซลล์จึงหันมาใช้ซูโครสต่อไป นอกจากนี้คลอสตริเดียมยังสามารถใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ ได้อีก โดยการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของคลอสตริเดียมสายพันธ์ต่างๆ ในน้ำตาลผสม (กรัม: กลูโคส 23-25 แมนโนส 4.5-5.2 อาราบิโนส 9.2-10.3 และ ไซโลส 18-20 กรัมต่อลิตร) พบว่าส่วนมากจะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส อาราบิโนส เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตตัวทำละลายเป็นอันดับแรกก่อน จากนั้นจึงใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ แต่ก็ขึ้นกับชนิดของสายพันธ์จุลินทรีย์ เช่น *C. acetobutylicum* ATCC 824 จะใช้กลูโคสก่อนตามด้วยอาราบิโนส ไซโลส เซลโลไบโอส กาแลคโตส และแมนโนส ตามลำดับ [34,35]

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการหมักแบบกะ เป็นกระบวนการหมักในระบบปิดที่มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด แต่เป็นกระบวนการหมักที่ง่ายในการดำเนินการ และมีความเสี่ยงในการปนเปื้อน (Contamination) จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นน้อย โดยการหมักน้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตบิวทานอลแบบกะจะใช้ความเข้มข้นน้ำตาลในช่วง 50-60 กรัมต่อลิตร มีระยะเวลาการหมัก 36-72 ชั่วโมง ได้ปริมาณตัวทำละลายรวมในช่วง 12 - 20 กรัมต่อลิตร โดยจากงานวิจัยของ จิรกานต์ และคณะ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังสดและผักตบชวาด้วยเอนไซม์ โดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง ในช่วง 4.5-5.5 โดยกระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าสามารถผลิต บิวทานอลได้ 8.94, 7.62 และ 5.98 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลที่ได้จากย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังสดและผักตบชวา ตามลำดับ [5]

ในปี 2552 ชุติมณฑน์ และคณะ ได้ศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสจากการย่อยผักตบชวา โดยพบว่าเมื่อใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจะสามารถผลิตบิวทานอลได้ 10.43 กรัมต่อลิตร [6] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อกับกระบวนการหมักบิวทานอลแบบกะ ซึ่งแสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับกระบวนการหมักบิวทานอลแบบกะ (Batch)

กระบวนการ	จุลินทรีย์	อัตราผลผลิต (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	ผลได้ตัวทำละลาย (เปอร์เซ็นต์)	ตัวทำละลาย (กรัมต่อลิตร)	รายละอียด	เอกสารอ้างอิง
แบบกะ	*C. beijerinckii* BA101	0.34	0.42	24.2	กลูโคส 59.8 กรัมต่อลิตร	[29]
แบบกะ	*C. acetobutylicum* ATCC 824	-	0.31	18.5	กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร	[5]
แบบกะ	*C. acetobutylicum* P262	0.07	0.32	7.0	แลคโตรส 45 กรัมต่อลิตร	[19]
แบบกะ	*C. beijerinckii* NCIMB 8052	-	0.45 (บิวทานอล)	11.2 (บิวทานอล)	กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร 36 มิลลิโมล บิวทิริค	[30]
แบบกะ	*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4	-	0.32 (บิวทานอล)	16.4 (บิวทานอล +อะซีโตน)	กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร	[7]
แบบกะ	*C. acetobutylicum* P-262	0.12	0.29	5.21	แป้ง 50 กรัมต่อลิตร	[10]

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

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

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

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

3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuger) Kubota 5100 apan, Kubota Corporation, Japan

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

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

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

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

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

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 น้ำตาลกลูโคส (Ajax Finechem, Australia)

3.2.2 น้ำตาลซูโครส (Ajax Finechem, Australia)

3.2.3 น้ำอ้อยไม่ใส่สารกันบูด จากตลาดท่าน้ำสี่พระยา

3.2.4 ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.5 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Ajax Finechem, Australia)

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

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

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

3.2.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.10 แอมโมเนียมอะซิเตต (CH_3COONH_4) (Ajax Finechem, Australia)

3.2.11 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (Himedia , India2)

3.2.12 สารสกัดเอนไซม์เคซิน (Tryptone) (Himedia , India2)

3.2.13 Reinforced Clostridial Medium (Himedia , India2)

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

3.2.15 อาซิโตน (Acetone) (May & Baker,British)

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

3.2.17 กรดบิวทิริค (Butyric acid) (Merck,)

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

3.2.19 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) (May & Baker,Britis)

3.2.20 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

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

3.3.2 *C. butylicum* TISTR 1032 จากคลังเก็บรักษาสายพันธุ์ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (ฝวช.) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.3.3 คลอสตริเดียมสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย จากหน่วยปฏิบัติการการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 กระบวนการหมัก (The Fermentation Process)

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการหมัก

การเพาะเชื้อจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการขยายปริมาณเชื้อ โดยเริ่มจากการนำหัวเชื้อที่เก็บภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหาร Reinforced Clostridial Medium (RCM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อโรค (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตรา 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่สอง เป็นการเตรียมกล้าเชื้อในระดับขวดเขย่าก่อนลงถังหมัก โดยการเตรียมสารละลายอาหารตามส่วนประกอบของอาหารสูตรที่ 1 หรือ 2 โดยรายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ก ในปริมาตร 60 มิลลิลิตร ในขวดเขย่า (anaerobic flask) โดยใช้สารตั้งต้นเป็นซูโครสที่ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อ แล้วผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตรา 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใส่กล้าเชื้อที่ทำการขยายพันธุ์ใหม่ 6 มิลลิลิตร (10เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร RCM จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.4.2 กระบวนการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 1 ลิตร

เตรียมสารอาหารน้ำอ้อย กลูโคส หรือ ซูโครส ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 1 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยแยกเป็นสองส่วน คือ สารละลายน้ำตาลจะทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วนสารอาหารอื่นๆ เตรียมตามสูตรอาหารที่ต้องการใช้ และถ่ายลงถังหมัก นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วผ่านแก๊สไนโตรเจนในอัตรา 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทกล้าเชื้อว่องไว (active inoculum) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เตรียมไว้ในขวดเขย่าลงในถังหมัก และทำการผ่านแก๊สไนโตรเจนอีกเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างการหมักควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 นอร์มอล และควบคุมอุณหภูมิโดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 35-37 องศาเซลเซียส ปรับความเร็วรอบเครื่องกวนในถังหมักที่ 100 - 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ใช้เวลาในการหมัก 72-96 ชั่วโมง

3.5 การศึกษาผลของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตบิวทานอล

ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล จากการหมักสารอาหารน้ำอ้อย กลูโคสและซูโครส โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ 1 ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และควบค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมักไว้ที่ 5.5 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณการใช้น้ำตาลตามช่วงเวลาการหมัก

3.6 การศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการผลิตบิวทานอล

ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลของคลอสตริเดียม 3 สายพันธุ์ คือ *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* TISTR 1032 (ฝวช.) และคลอสตริเดียมสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย โดยการหมักสารอาหารน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ตามช่วงเวลาการหมัก

3.7 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ต่อการผลิตตัวบิวทานอล

ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล โดยการหมักสารอาหารน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ 1 โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ ไม่ควบคุม, 4.5, 5.0 และ 5.5 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ตามช่วงเวลาการหมัก

3.8 การศึกษาผลของสูตรสารอาหารต่อการผลิตบิวทานอล

ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล โดยใช้อาหารสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ 2 (ภาคผนวก ก) โดยการหมักสารอาหารน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ตามช่วงเวลาการหมัก

3.9 การศึกษาผลของความเข้นข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอล

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลต่อการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอล โดยการหมักสารอาหารน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ตามช่วงเวลาการหมัก

3.10 การศึกษาการศึกษาการใช้มันสำปะหลังสดเปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตตัวทำละลาย

ทำการศึกษาการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสด ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 โดยใช้เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์และปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น และปริมาณน้ำตาลที่ใช้ ตามช่วงเวลาการหมัก เปรียบเทียบผลกับการหมักอ้อย ตามการทดลองที่ 3.9

3.11 การวิเคราะห์ปริมาณ บิวทานอล อาซิโตน เอทานอล กรดอะซิติค และกรดบิวทิริค

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี่ โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Shimadzu Model Gc 7AG, Japan กับ recorder integrator ของ Chromatopac CR1A, japan) เพื่อทำการวิเคราะห์

โดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ใช้คอลัมน์ยาว 2 เมตร ขนาด 1/8 นิ้ว บรรจุด้วย porapak Q 80-100 mesh อุณหภูมิคอลัมน์คงที่ที่ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิอินเจคเตอร์ (injector) 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิดีเทคเตอร์ (detector) 300 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณของผลิตภัณฑ์หาได้จากการเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (extermal standard) โดยที่บิวทานอล อะซิโตน เอทานอล กรดอะซิติก และกรดบิวทิริค มีรีเทนชันไทม์ (retention time) เป็น 4.09, 1.77, 1.33, 3.10 และ 9.96 ตามลำดับ

3.12 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

ใช้หลอดฉีดยาดูดน้ำหมักที่ต้องการวัดประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็ก นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยอัตาการหมุน 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาประมาณ 1 มิลิลิตร ใส่ในหลอดขนาดเล็กที่มีฝาปิด นำไปวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟฟี่

3.13 การหาความเข้มข้นของเซลล์

วัดความเข้นเซลล์ด้วยการหาน้ำหนักแห้งร่วมกับการวัดค่าความขุ่น (Optical density, OD) การวัดค่าความขุ่น โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-2450, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ส่วนการหาน้ำหนักแห้งทำได้โดยการนำสารตัวอย่างน้ำหมัก 20 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่ากับ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทของเหลวส่วนใสที่อยู่ด้านบนออกทิ้งให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน ล้างด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสออก แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันอีกครั้ง เทลงในอะลูมิเนียมฟอยล์ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักอะลูมิเนียมฟอยด์ก่อนการเท นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.14 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี DNS analysis หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสและซูโครสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส (Glucose Analyser YSI รุ่น 27)

บทที่ 4

ผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาผลของชนิดวัตถุดิบต่อการผลิตบิวทานอล

ในการทดลองศึกษาชนิดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล ของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยการแปรผันวัตถุดิบ 3 ชนิด คือ น้ำอ้อย กลูโคสและซูโครส ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการหมัก คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 และในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูป 4.1-4.6

จากการศึกษารูปแบบการหมัก ในรูปที่ 4.1-4.6 พบว่า เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีรูปแบบการหมักในลักษณะเดียวกัน คือ ในชั่วโมงแรกๆ ของการหมัก จะไม่มีการสร้างผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในช่วงการปรับตัวกับอาหารและสภาวะแวดล้อมใหม่ เมื่อเวลาผ่านไป จึงเริ่มมีการใช้น้ำตาลจำนวนมากในการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของความเข้มข้นเซลล์ ในระยะนี้มีการผลิตกรดบิวทิริคและกรดอะซิติคเป็นส่วนใหญ่ จัดเป็นระยะสร้างกรด เมื่อการหมักดำเนินไปจนได้ความเข้มข้นกรดรวมสูงสุดค่าหนึ่ง เชื้อจะมีการใช้กรดทั้งสองชนิดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้น้ำตาลที่เหลือ เพื่อผลิตตัวทำละลายสามชนิด คือ อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล จัดเป็นระยะสร้างตัวทำละลาย ทำให้ความเข้มข้นกรดทั้งสองชนิดลดลง พร้อมกับความเข้มข้นตัวทำละลายรวมค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา จนกระทั่งมีความเข้มข้นสูงสุด มีผลทำให้หยุดกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ และเซลล์กลายเป็นสปอร์ในที่สุด ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการหมักจนสิ้นสุด คือ 96 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.1 แสดงผลการทดลองของกระบวนการผลิตตัวทำละลายโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของเชื้อคลอสตริเดียม พบว่า ช่วงแรกเซลล์มีการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีอยู่ในน้ำอ้อย และน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสที่เกิดจากการย่อยน้ำตาลซูโครสบางส่วน จากการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความร้อนเป็นอันดับแรก โดยเชื้อจะใช้น้ำตาลเหล่านี้หมดภายใน 12 ชั่วโมง แรกของการหมัก ในระยะเวลาต่อมา อัตราการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลช้ากว่าในระยะเวลาแรก เนื่องจากเซลล์ต้องมีการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำอ้อยเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสก่อน จึงใช้น้ำตาลที่ได้นี้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ต่อไป จนถึงชั่วโมงที่ 72 การใช้น้ำตาลของเชื้อจุลินทรีย์จะเริ่มคงที่ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักใน 96 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลเหลือในระบบ 14.80 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่า จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเริ่มช้าลงเนื่องจากเซลล์ต้องมีการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยน้ำตาลซูโครส หลังจากนั้นความเข้มข้นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการใช้น้ำตาล จากผลที่ได้ทำให้เห็นว่าเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีความสามารถในการใช้น้ำอ้อยได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีช่วงของการปรับตัวสู่สภาวะแวดล้อมและอาหารใหม่ (lag phase) ที่สั้น

ส่วนการสร้างกรดที่แสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการผลิตกรดบิวทิริคและอะซิติคในความเข้มข้นสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยมีผลได้กรดรวมเท่ากับ 47.31 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.21 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ความเข้มข้นสูงสุดของกรดทั้งสองมีค่าเท่ากับ 14.78 และ 11.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 96 ชั่วโมง จะมีความเข้มข้นของกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบ 10.88 และ 9.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สำหรับขั้นตอนการผลิตตัวทำละลายนั้น เชื้อจุลินทรีย์จะใช้กรดที่ผลิตขึ้นในขั้นตอนการสร้างกรดร่วมกับการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างตัวทำละลายอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 17.29 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 7.47 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล 0.31, 1.96 และ 5.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองกระบวนการผลิตตัวทำละลายและกรดโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก แสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 จากรูปแบบการหมัก พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตจนมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 มีค่าเท่ากับ 2.48 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลานี้มีการผลิตกรดบิวทิริคและอะซิติคร่วมกัน โดยเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีช่วงของการปรับตัวเพื่อใช้น้ำตาล เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ได้โดยตรง หลังนั้นการผลิตกรดจะดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง โดยมีผลได้กรดรวมท่ากับ 34.79 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นกรดบิวทิริคและอะซิติคมากที่สุดเท่ากับ 8.85 และ 5.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลาประมาณชั่วโมงที่ 66 ของการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบเท่ากับ 8.84 และ 5.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อสร้างกรดพร้อมกับการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ในระยะเวลาที่เร็วกว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้น้ำอ้อย คือมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 5.74 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิต

ตัวทำละลายรวมได้เท่ากับ 2.39 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 0.42 1.38 และ 0.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการผลิตบิวทานอลในสัดส่วนที่มากกว่าการผลิตเอทานอลและอะซิโตน

จากผลการทดลองกระบวนการผลิตตัวทำละลายและกรดโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก แสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6 เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ สำหรับการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ พบว่า มีรูปแบบการใช้น้ำตาลเช่นเดียวกับการใช้น้ำอ้อย แต่ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลซูโครส ไม่สูงเท่ากับการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก 96 ชั่วโมง มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือค้างในระบบสูงถึง 28.33 กรัมต่อลิตร โดยน้ำตาลส่วนใหญ่ถูกใช้ไปเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างกรด โดยมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.69 กรัมต่อลิตร ที่เวลาประมาณ 36 ชั่วโมงของการหมัก ในช่วงเวลานี้มีการสร้างกรดบิวทิริคและอะซิติคร่วมกันไป โดยให้ผลได้กรดรวมเท่ากับ 42.44 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และความเข้มข้นของกรดบิวทิริคและอะซิติคมากที่สุดเท่ากับ 7.52 และ 7.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบเท่ากับ 7.50 และ 7.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากรูปที่ 4.6 จะเห็นว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างกรดพร้อมกับการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ในระยะเวลาที่ช้ากว่าการหมักโดยใช้กลูโคส โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 6.33 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้เท่ากับ 2.19 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 0.41, 1.02 และ 0.76 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตบิวทานอลในสัดส่วนที่มากกว่าการผลิตเอทานอลและอะซิโตน

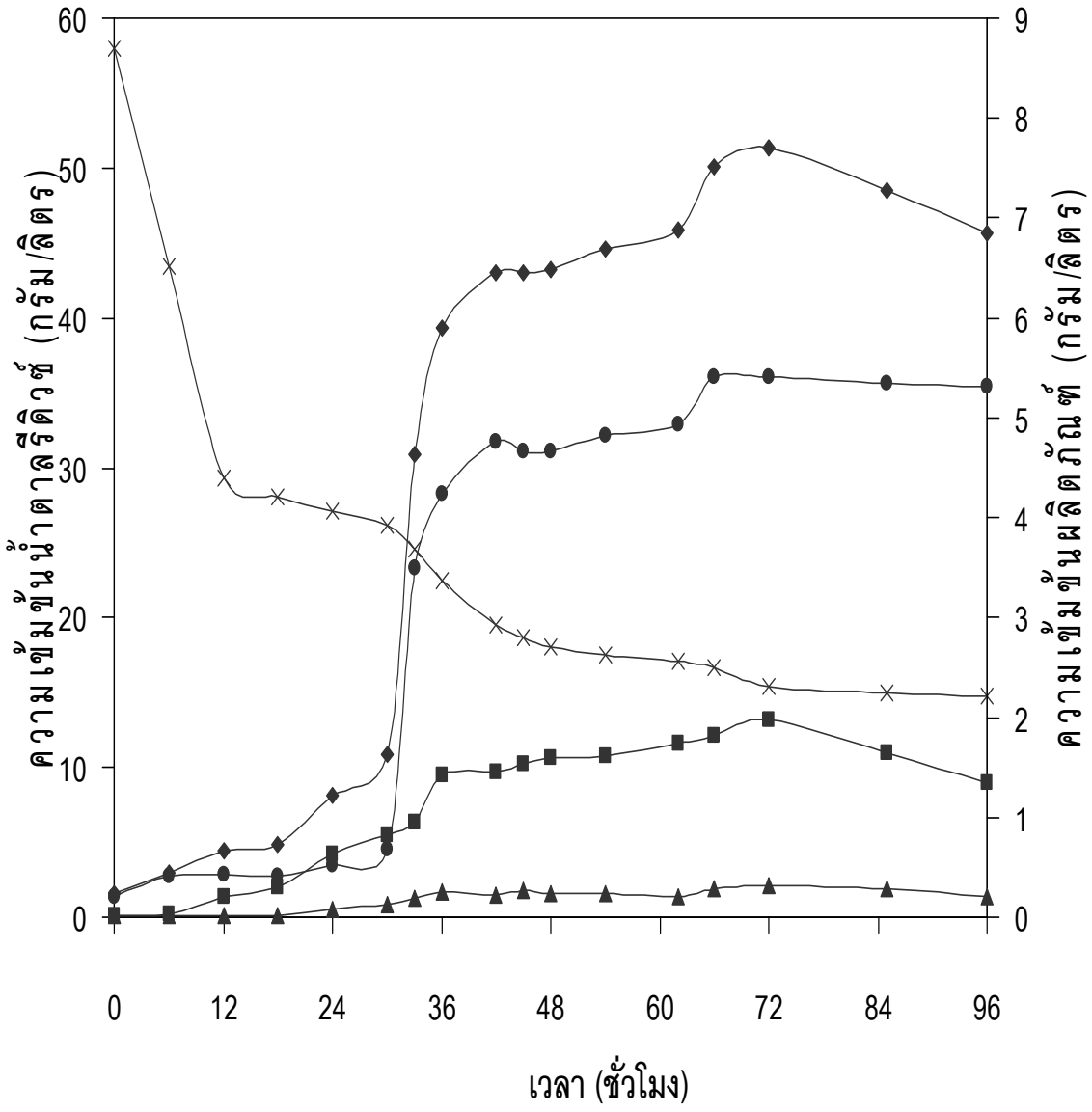
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ของวัตุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และ 4.8 และตารางที่ 4.1 พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตตัวทำละลายได้มากที่สุด โดยมีความเข้มข้นของตัวทำละลายมากกว่าการใช้กลูโคสและซูโครสประมาณ 3 เท่า ทั้งยังให้ความเข้มข้นของกรดรวมที่เหลือในระบบในปริมาณที่มากกว่าประมาณ 1.4 เท่า โดยผลิตเอทานอลมากกว่าบิวทานอลและอะซิโตน รองลงมาคือการใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส ตามลำดับ แต่การใช้น้ำตาลกลูโคส สามารถผลิตตัวทำละลายได้มากกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสไม่มากนัก

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบเฉพาะการผลิตบิวทานอลเมื่อใช้วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีการใช้น้ำอ้อยเพื่อผลิตบิวทานอลได้มากที่สุด

สาเหตุที่เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อการผลิตกรดและตัวทำละลายได้ดีกว่านั้น อาจเกิดจากการที่น้ำอ้อยมีองค์ประกอบเป็นสารอาหารอื่นๆ เช่น วิตามินและเกลือแร่อีกมากมาย ที่สามารถส่งเสริมให้การผลิตสร้างภัณฑ์ดำเนินไปได้อย่างดี นอกเหนือจากน้ำตาลซูโครสที่เป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ และอัตราการผลิตกรดจำเพาะ ในแต่ละการทดลองมาเปรียบเทียบดังแสดงในรูปที่ 4.9 และสรุปผลการคำนวณในตารางที่ 4.1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.06, 0.22 และ 0.10 ชั่วโมง$^{-1}$ เมื่อใช้น้ำอ้อย กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ส่วนอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะมีค่าเป็น 0.08, 0.01 และ 0.008 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ และอัตราการผลิตกรดจำเพาะมีค่ามากกว่าอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ โดยมีค่าเท่ากับ 0.22, 0.06 และ 0.05 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส เพราะทำให้กระบวนการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงกว่า และมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อเป็นแหล่งอาหารของการหมักอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอล

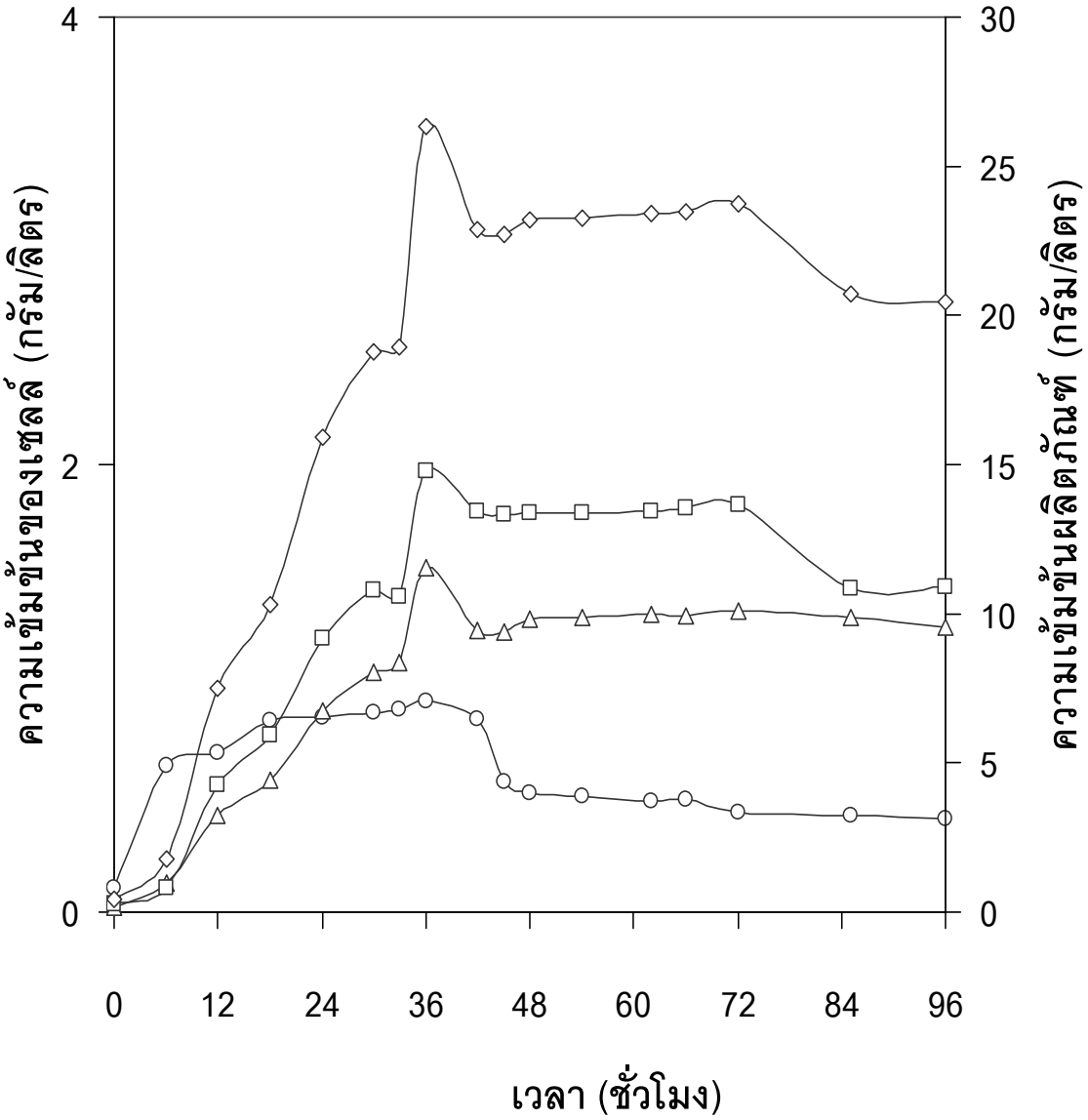


รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

X น้ำตาลรีดิวซ์ ▲ อะซิโตน

■ บิวทานอล ● เอทานอล

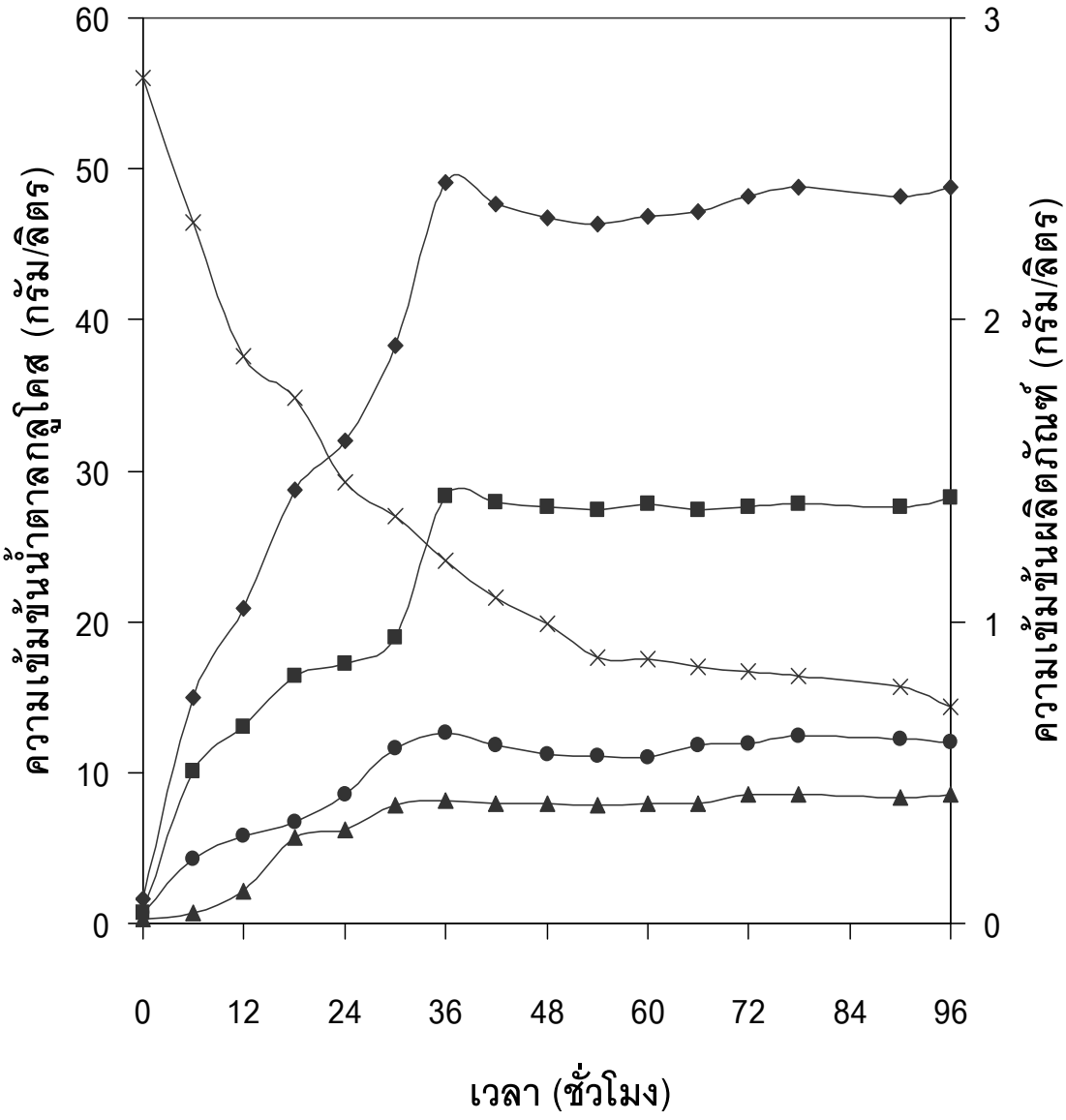
◆ ตัวทำละลายรวม



รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

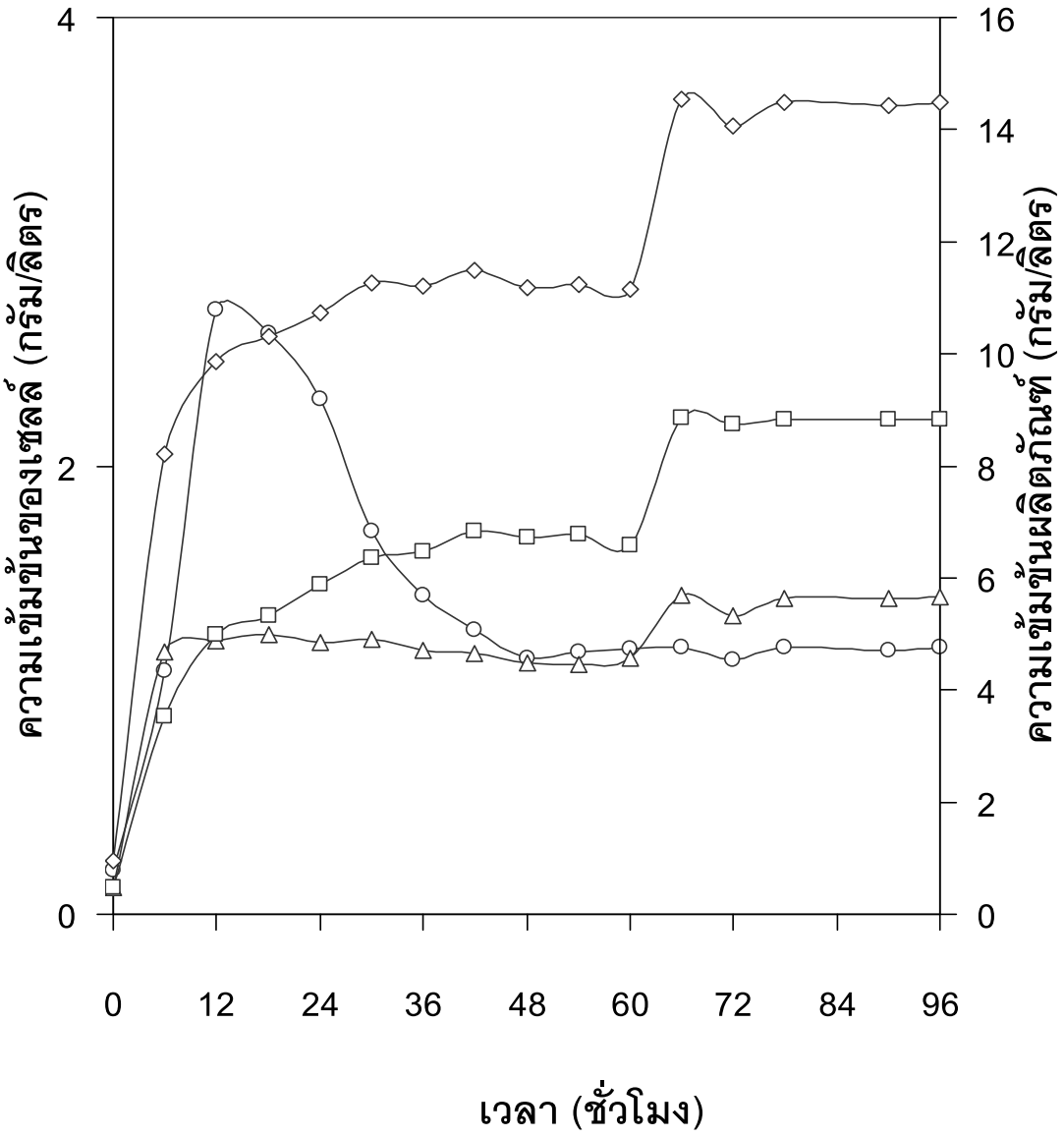
○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

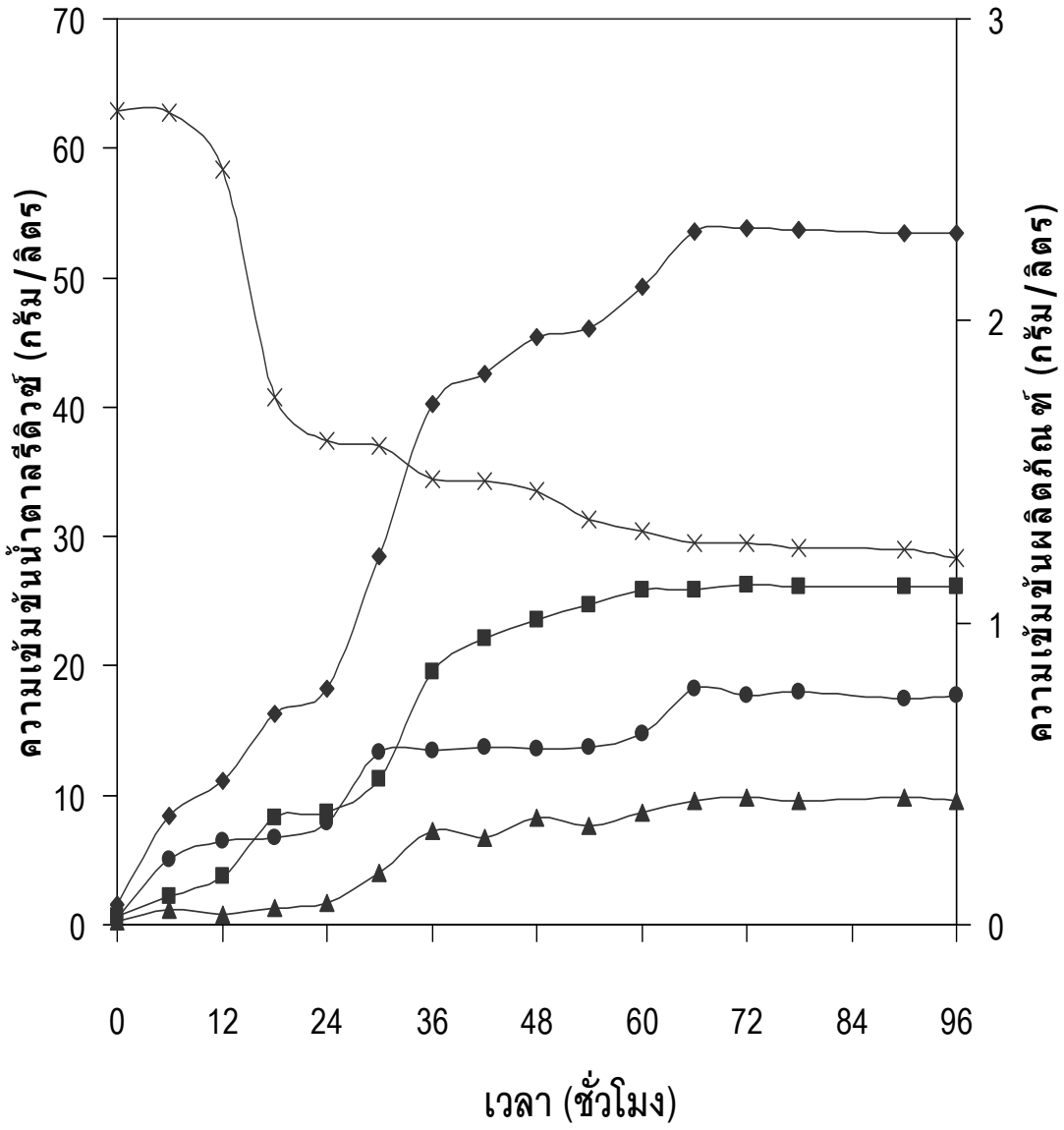
X น้ำตาลกลูโคส
▲ อะซิโตน
■ บิวทานอล
● เอทานอล
◆ ตัวทำละลายรวม



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

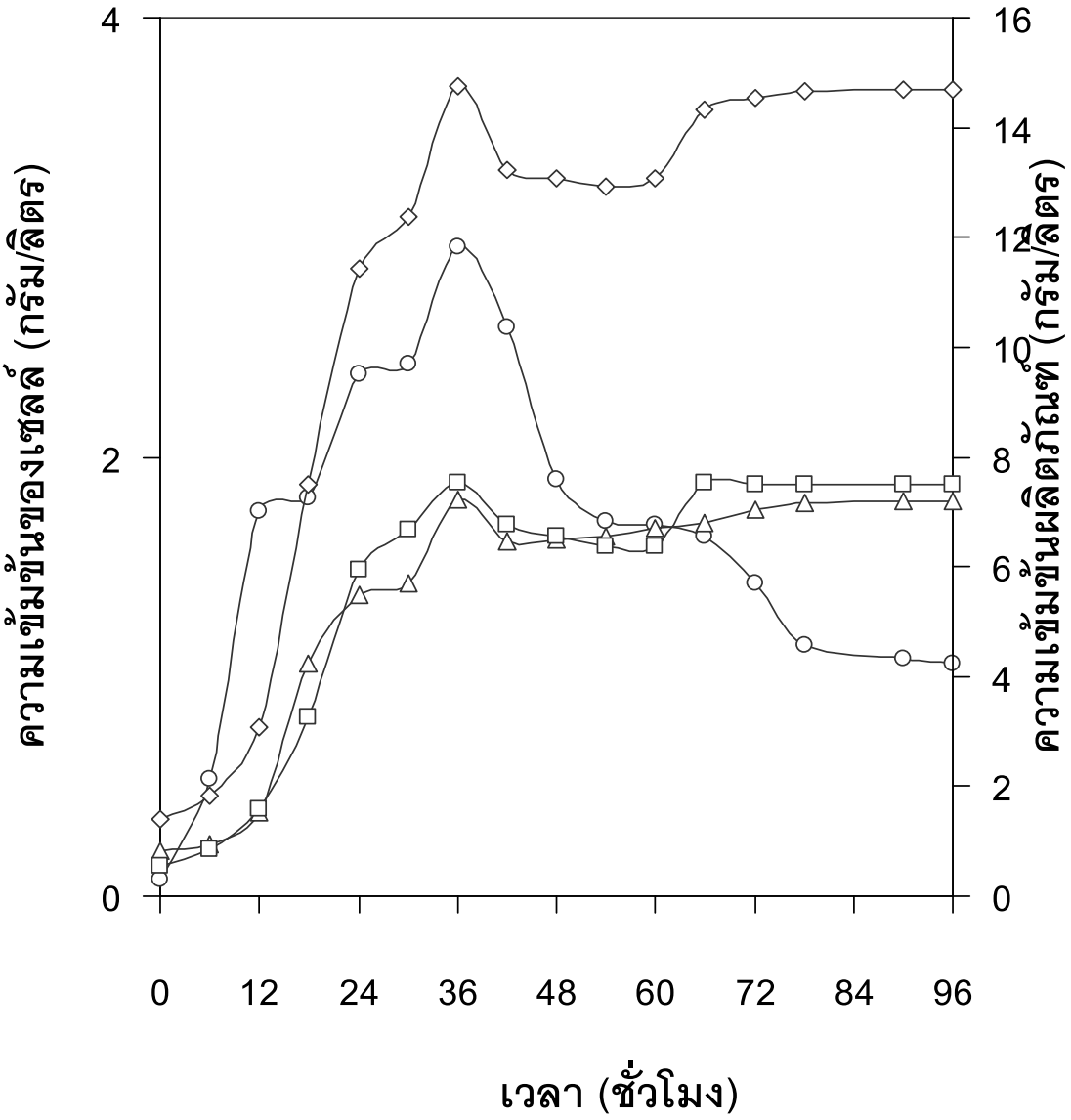
○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

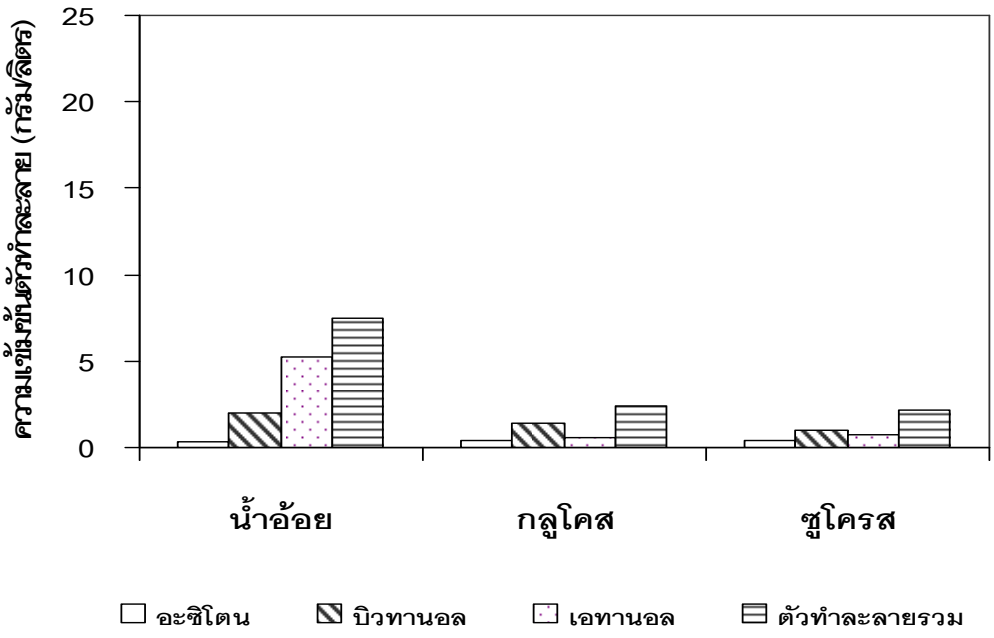
X น้ำตาลรีดิวซ์
▲ อะซิโตน
■ บิวทานอล
● เอทานอล
◆ ตัวทำละลายรวม



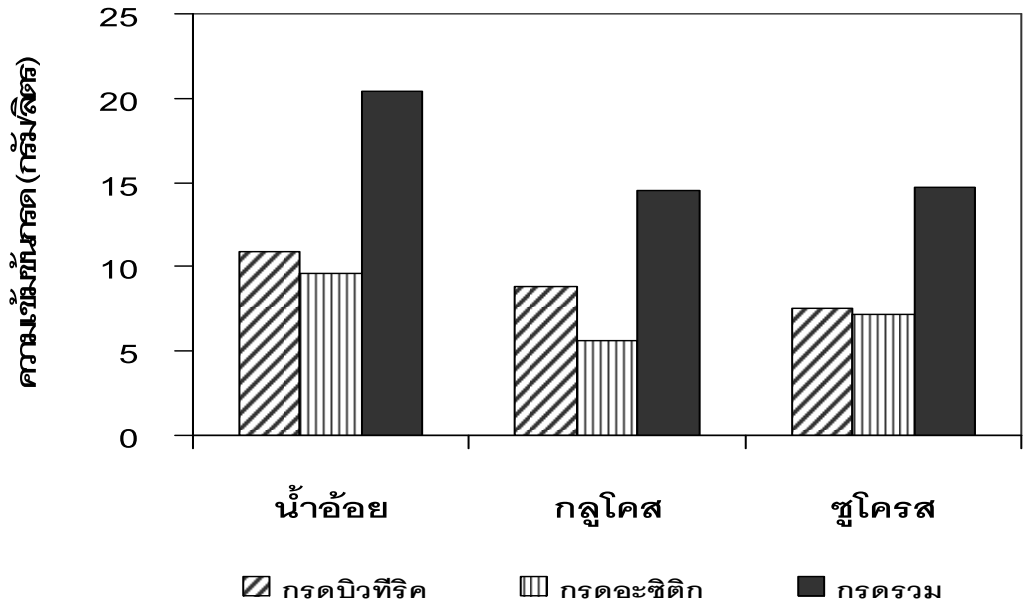
รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

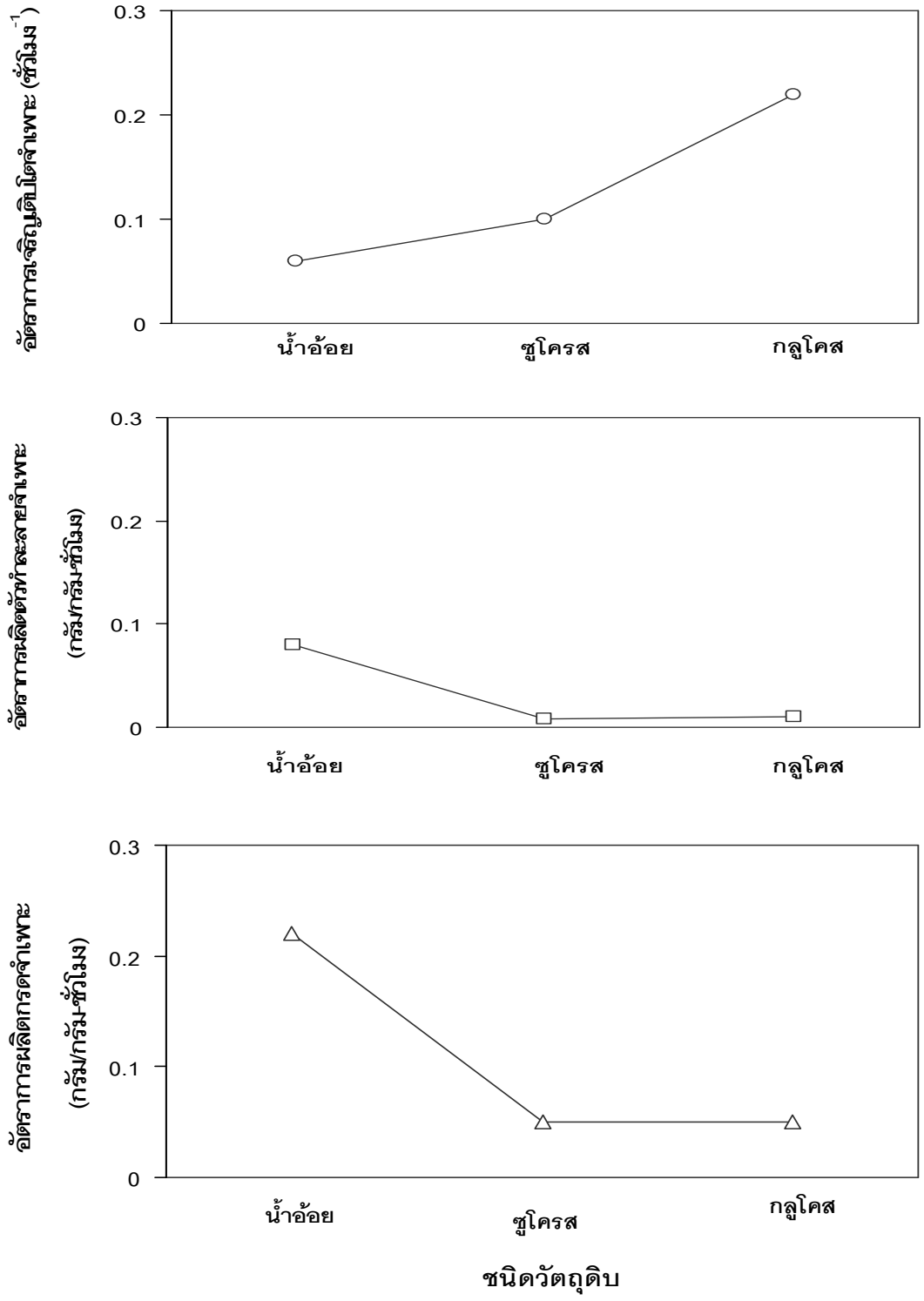
□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.7 ผลของชนิดวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตตัวทำละลาย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



รูปที่ 4.8 ผลของชนิดวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรด ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



รูปที่ 4.9 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักเมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ □ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ

Δ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ

ตารางที่ 4.1 ผลของชนิดวัตถุดิบต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

ตัวแปรการหมัก	วัตถุดิบ		
	น้ำอ้อย	กลูโคส	ซูโครส
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	0.31	0.42	0.41
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	1.96	1.38	1.02
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	5.20	0.59	0.76
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	7.47	2.39	2.19
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	10.88	8.84	7.50
กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	9.56	5.65	7.18
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	20.44	14.49	14.68
น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	58.00	56	62.92
น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	43.20	41.65	34.59
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.99	2.48	2.69
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	96	96	96
ผลได้บิวทานอล (butanol yield) (เปอร์เซ็นต์)	4.54	3.31	2.95
ผลได้ตัวทำละลายรวม (solvent yield) (เปอร์เซ็นต์)	17.29	7.41	6.69
ผลได้กรดรวม (acid yield) (เปอร์เซ็นต์)	47.31	34.79	42.44
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.02	0.01	0.01
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.08	0.02	0.02
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.21	0.15	0.15
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.06	0.22	0.10
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.08	0.01	0.008
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.02	0.006	0.004
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.22	0.06	0.05

4.2 ผลการศึกษาผลของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการผลิตบิวทานอล

ในกระบวนการหมักทางชีวภาพ จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักมีส่วนสำคัญมากในการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน หรือแม้แต่จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ จะมีการให้ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ไม่เท่ากัน ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษาการหมักของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ อีก 2 สายพันธุ์ คือ เชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทยเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยทำการหมักในสภาวะเดียวกัน คือ ใช้น้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 4.10-4.16

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและกรด ในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 แสดงในรูปที่ 4.10 และ 4.11 เมื่อพิจารณารูปแบบการหมัก พบว่า มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างต่อเนื่อง มีการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงเริ่มคงที่ ขณะเดียวกันมีการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์อย่างรวดเร็วไปพร้อมกัน แสดงว่า เชื้อคลอสตริเดียมสามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อยได้ดี โดยน้ำตาลส่วนใหญ่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตและการสร้างกรด ทำให้ความเข้มข้นเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.20 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 16.5 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักใน 96 ชั่วโมง ให้ผลได้กรดรวมเท่ากับ 51.04 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และความเข้มข้นของกรดบิวทิริคและอะซิติคได้มากที่สุดเท่ากับ 13.72 และ 10.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้กรดที่สร้างขึ้นร่วมกับการใช้น้ำตาล เพื่อสร้างตัวทำละลาย คือ อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ทำให้มีความเข้มข้นกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบเท่ากับ 7.50 และ 7.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนการสร้างตัวทำละลายนั้น ให้ผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 13.96 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.07 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และความเข้มข้นตัวทำละลายรวมเท่ากับ 6.71 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.51, 2.23 และ 3.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลอง แสดงว่าเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 สามารถผลิตเอทานอลในสัดส่วนที่มากกว่าบิวทานอลและอะซิโตน

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและกรด ในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย แสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 เมื่อพิจารณารูปแบบการหมัก พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีการใช้น้ำตาลในน้ำอ้อย เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้มีการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็ว ในช่วงเริ่มต้นการหมัก จนถึงชั่วโมงที่ 6 โดยระยะนี้ เชื้อจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้หมดก่อน หลังจากนั้นจึงทำการปรับตัว

เพื่อใช้น้ำตาลซูโครสต่อไป โดยมีการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคส และ ฟรุคโตส ใน 6 ชั่วโมง ต่อมา หลังจากนั้นจึงมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว จนถึงชั่วโมงที่ 36 อัตราการใช้น้ำตาลเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการหมัก และมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในระบบ 28.89 กรัมต่อลิตร

เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาล ดังนั้นในระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก เชื้อคลอสตริเดียมมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากนั้นมีการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์น้อยลง เนื่องจากเซลล์เปลี่ยนระบบเมตาโบลิซึ่มมาใช้น้ำตาลซูโครส จากรูปที่ 4.13 จะเห็นได้ว่า การเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย มีลักษณะเหมือนขั้นบันได คือ มีการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ระยะหนึ่งแล้วจึงคงที่ หลังจากนั้นจึงเริ่มเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์อีกครั้งหนึ่ง เป็นแบบนี้ตลอดระยะเวลาการหมัก และให้ความเข้มเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.53 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันมีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างกรดบิวทิริคและอะซิติคไปพร้อมกัน เชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์นี้ มีการเปลี่ยนกรดอะซิติคและบิวทิริคเป็นตัวทำละลายอะซิโตนและบิวทานอล ในชั่วโมงที่ 36 และเป็นช่วงเวลาเดียวกับที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มคงที่ (รูปที่ 4.12) แต่ยังคงมีการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์หลังจากนั้น สันนิษฐานว่า เซลล์อาจมีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากน้ำตาลในน้ำอ้อย โดยให้ผลได้กรดรวมเท่ากับ 35.31 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และความเข้มข้นกรดบิวทิริคสูงสุดเท่ากับ 9.83 กรัมต่อลิตร ขณะที่มีการสร้างกรดอะซิติค ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเริ่มคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 18 จนสิ้นสุดการหมัก โดยให้ความเข้มข้นสูงสุด 3.08 กรัมต่อลิตร

จากรูปแบบการเจริญเติบโตและการผลิตกรด พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย มีการพัฒนาในการปรับตัวเพื่อใช้แหล่งอาหารชนิดใหม่ จัดเป็นคุณสมบัติที่ดีของเชื้อชนิดนี้

เมื่อพิจารณาการผลิตตัวทำละลาย พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์นี้ มีความสามารถในการผลิตตัวทำละลาย ได้ในปริมาณน้อยมาก โดยให้ผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 6.38 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ทำให้มีความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมเพียง 2.50 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักเพียง 2.29 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นบิวทานอล 0.17 กรัมต่อลิตร และอะซิโตนเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์โดยเชื้อคลอสตริเดียมทั้ง 2 สายพันธุ์ กับการสร้างผลิตภัณฑ์โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ดังแสดงในรูปที่4.14 และ 4.15 และตารางที่ 4.2 พบว่า กระบวนการหมักของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 สามารถผลิตตัวทำละลายรวมได้มากที่สุด โดยให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายมากกว่าเชื้อ *C. butylicum* TISTR

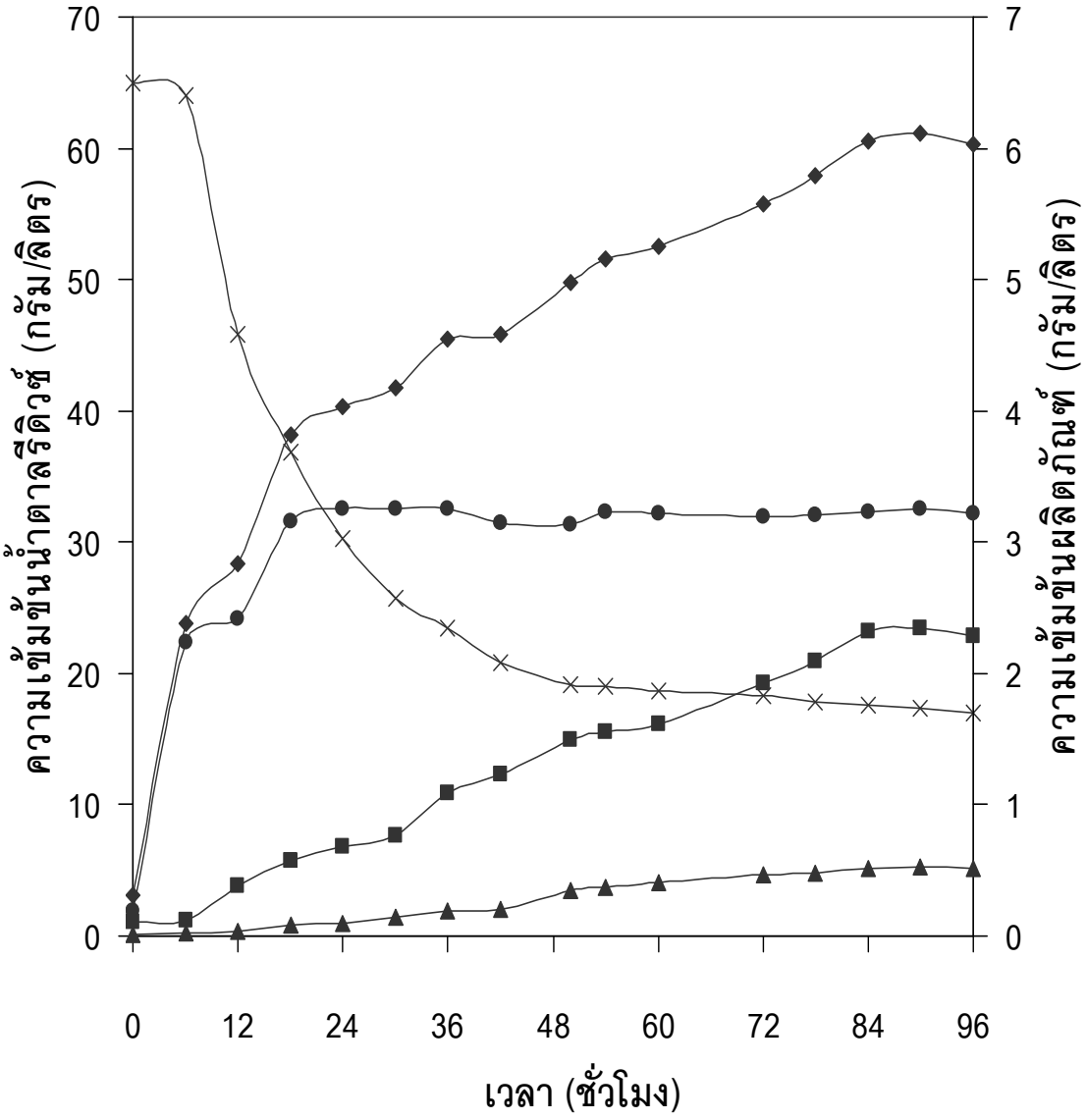
1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทยประมาณ 1.1 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ โดยมีเอทานอลในสัดส่วนมากที่สุด ส่วนความเข้มข้นของบิวทานอลที่ผลิตได้ มีค่าน้อยกว่าที่เชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 ผลิตได้ ส่วนการหมักของ *C. butylicum* TISTR 1032 ให้ความเข้มข้นของกรดรวมที่เหลืออยู่ในระบบสูงที่สุด ส่วนกระบวนการหมักของเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศ มีการผลิตตัวทำละลายน้อยที่สุด แต่สามารถใช้น้ำอ้อยในการเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากมีค่าความเข้มข้นเซลล์สูงสุดมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีกสองสายพันธุ์

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ และอัตราการผลิตกรดจำเพาะ ในแต่ละการทดลองมาเปรียบเทียบดังแสดงในรูปที่ 4.16 และสรุปผลการคำนวณในตารางที่ 4.2

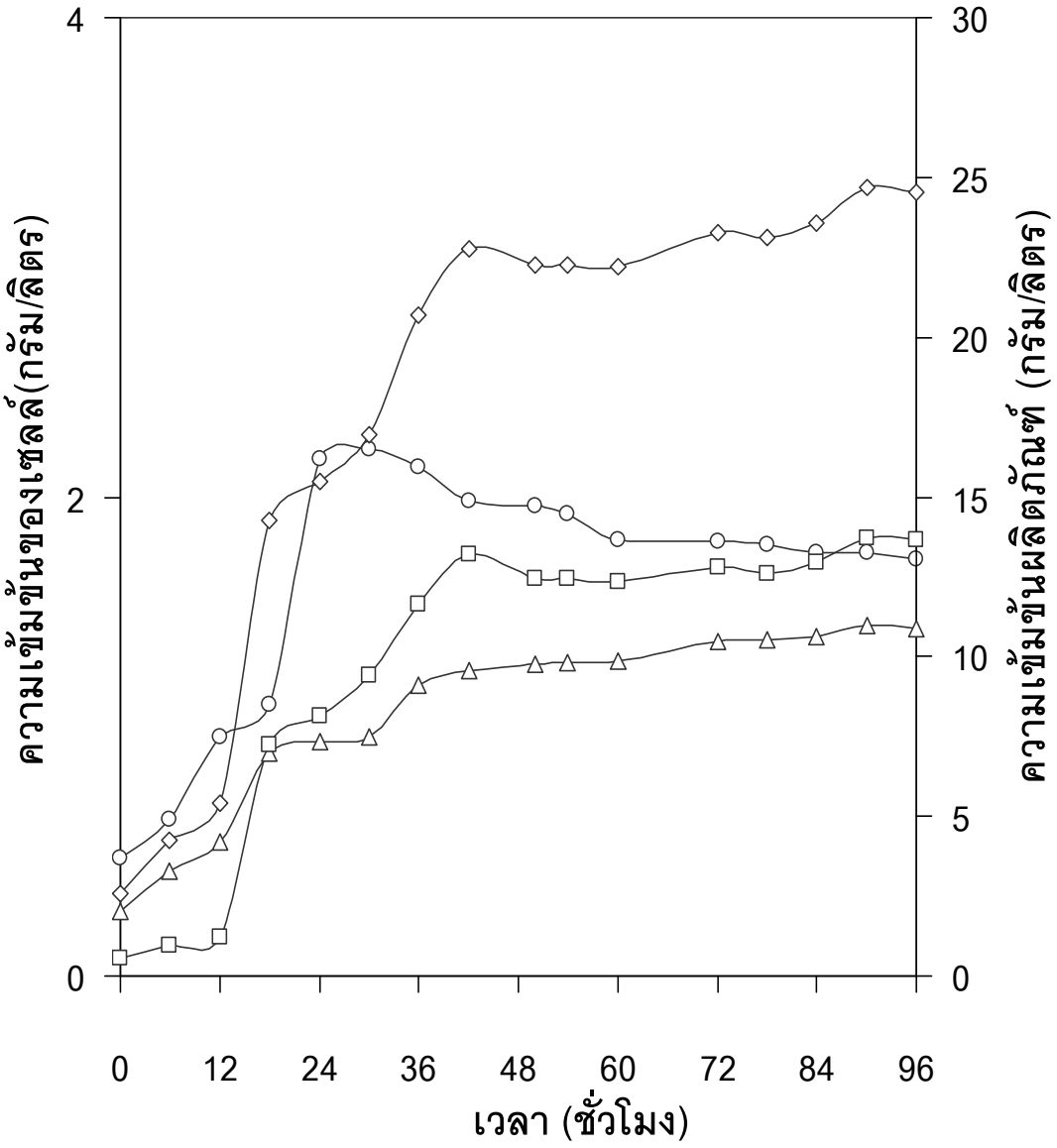
เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* TISTR 1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.06, 0.05 และ 0.02 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ ส่วนอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะมีค่าเป็น 0.08, 0.03 และ 0.01 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.21, 0.11 และ 0.06 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า อัตราการผลิตกรดจำเพาะมีค่ามากกว่าอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะในทั้งสามสายพันธ์

กระบวนการหมักของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีค่าจลน์ศาสน์ของการหมักสูงกว่ากระบวนการหมักของเชื้ออีกสองชนิด ดังนั้นกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อยโดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 จึงมีความเหมาะสมที่สุด

อย่างไรก็ตามเชื้อคลอสตริเดียมมีการสร้างตัวทำละลายและบิวทานอลในความเข้มข้นที่ต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป



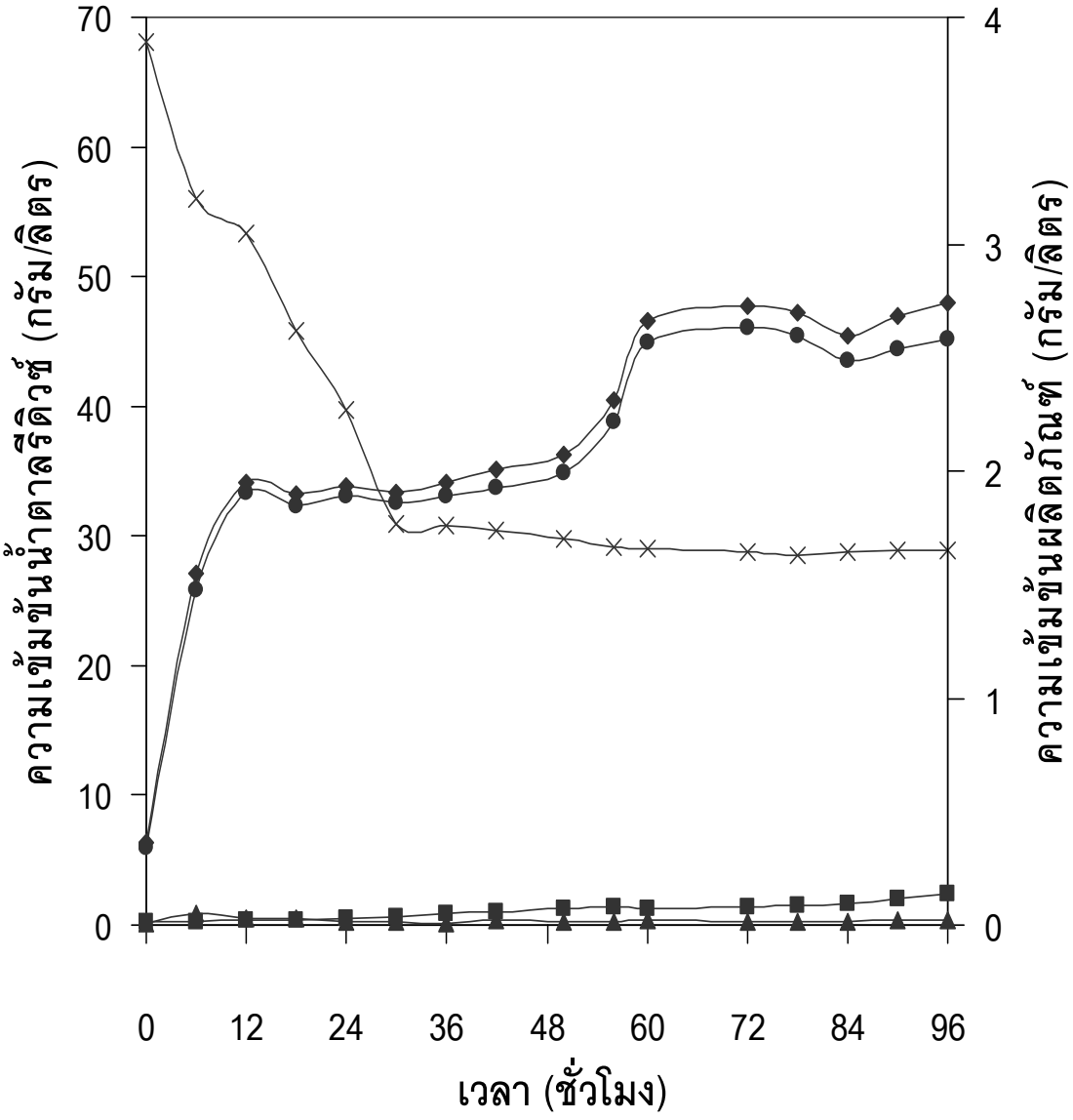
รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



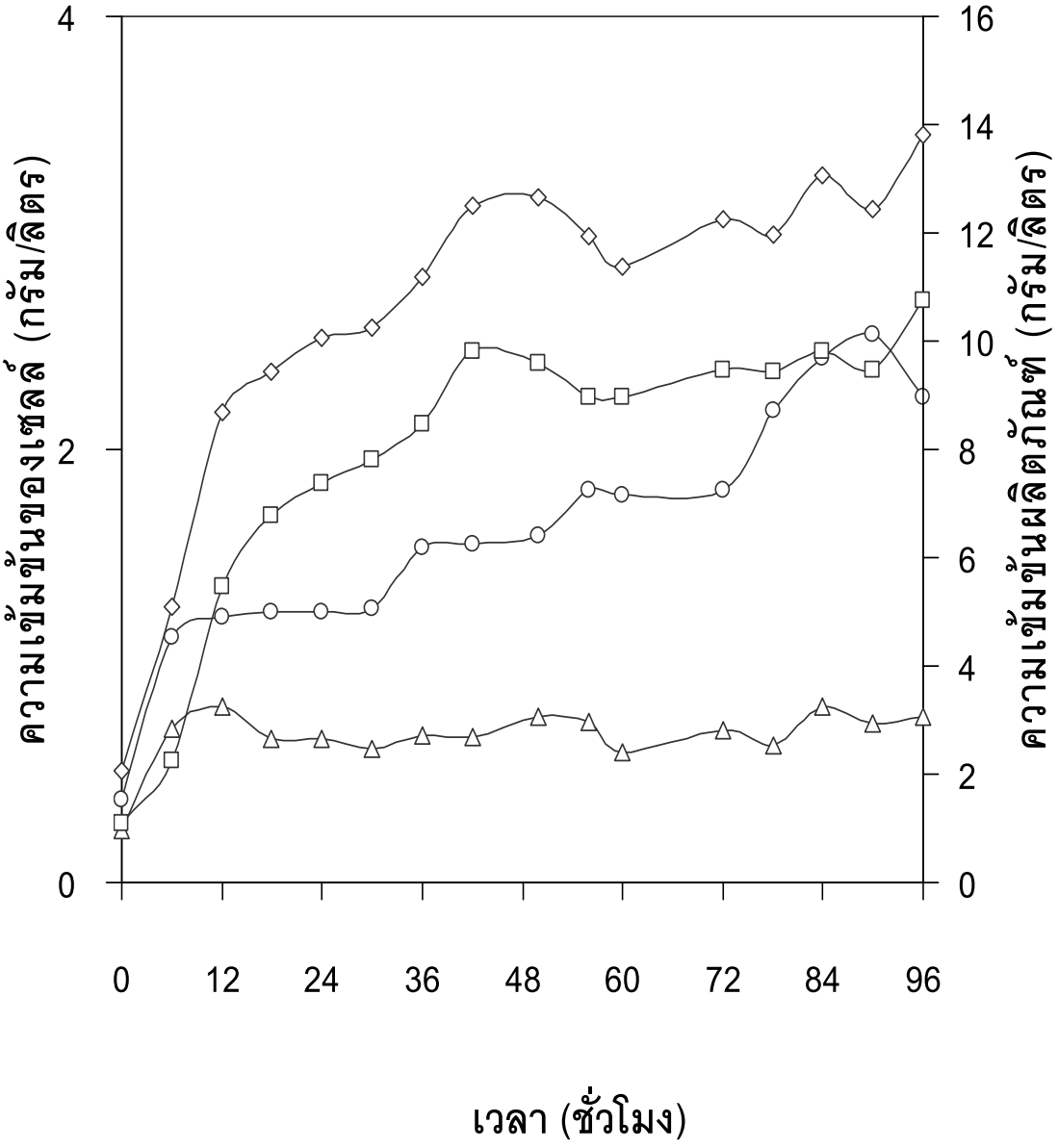
รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



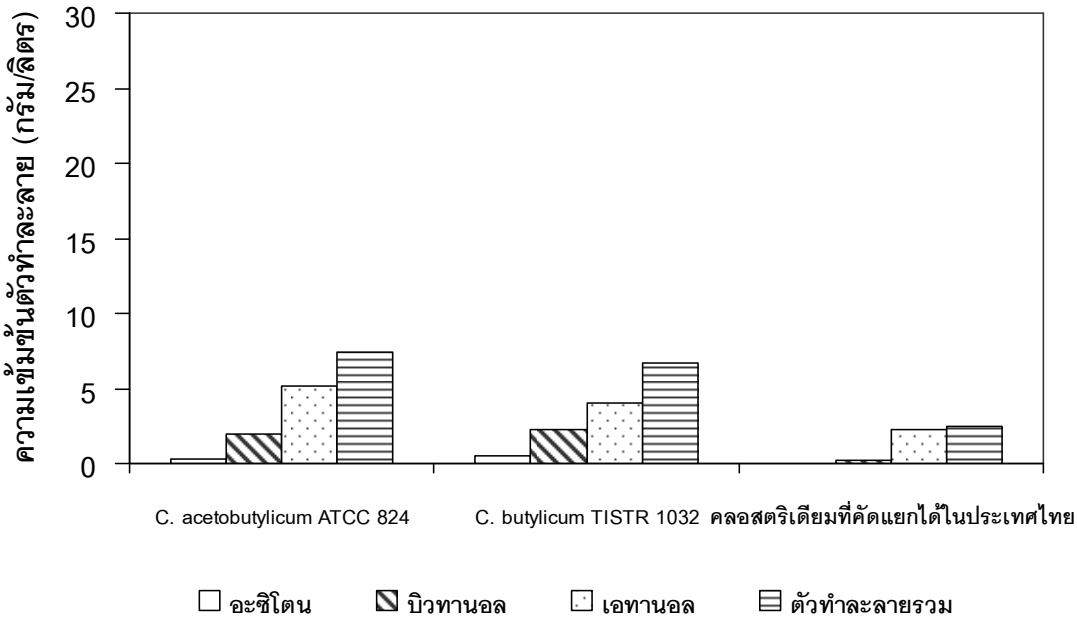
รูปที่ 4.12 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



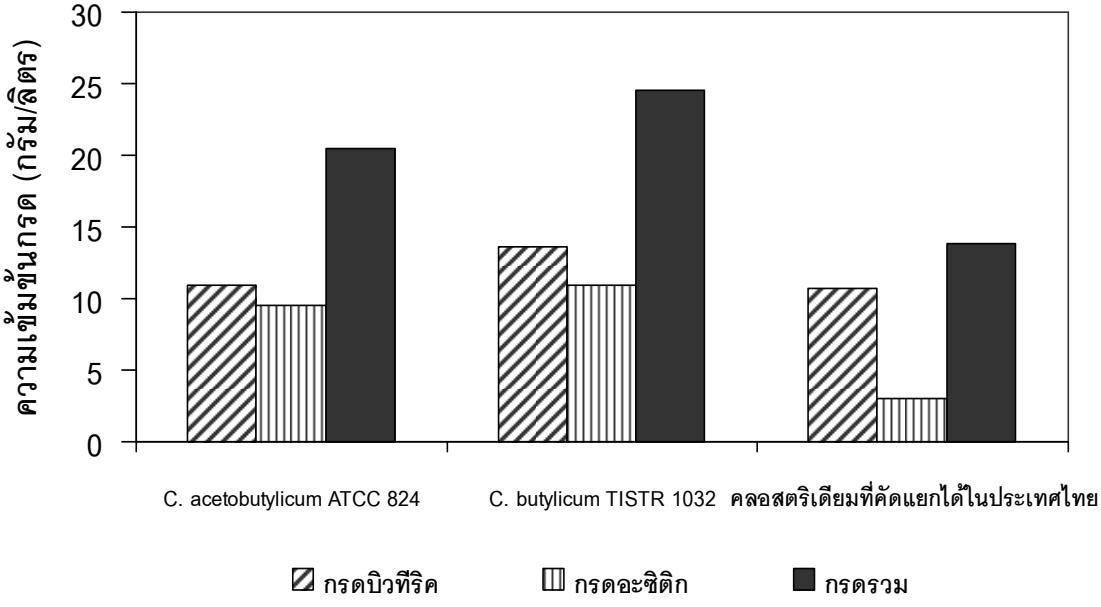
รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

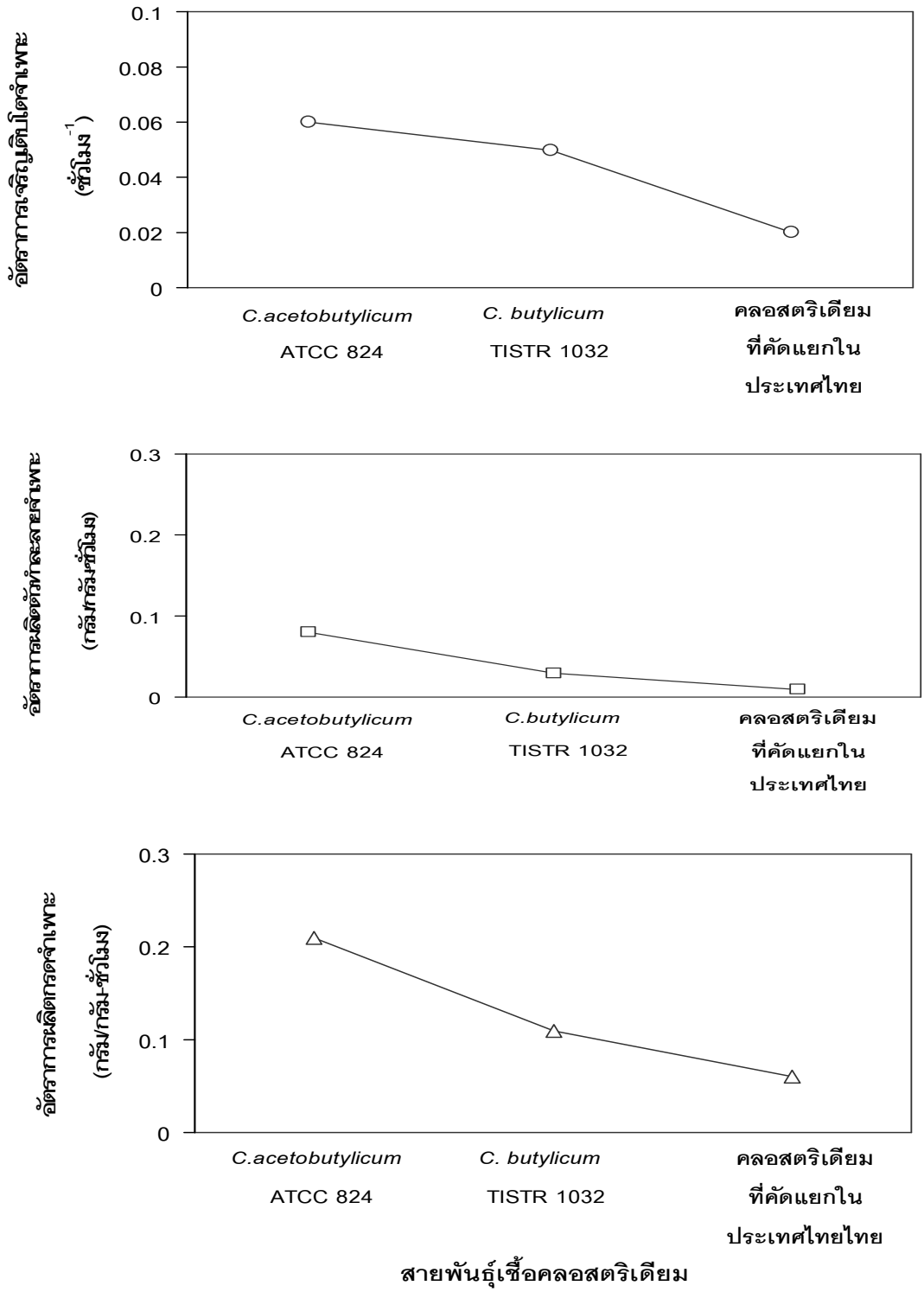
□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.14 ผลของชนิดสายพันธุ์คลอสตริเดียมต่อการผลิตตัวทำละลายโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



รูปที่ 4.15 ผลของชนิดสายพันธุ์คลอสตริเดียมต่อการผลิตกรดโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.5



รูปที่ 4.16 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก โดยเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธุ์ต่างๆ

○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ □ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ

Δ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดสายพันธุ์เชื้อคลอสตริเดียมต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิว์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

ตัวแปรการหมัก	จุลินทรีย์		
	C.acetobutylicum ATCC 824	*C.butylicum* TISTR 1032	คลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	0.31	0.51	0.04
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	1.96	2.23	0.17
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	5.2	3.97	2.29
ตัวทำละลายรวม	7.47	6.71	2.5
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	10.88	13.64	10.75
กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	9.56	10.89	3.08
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	20.44	24.53	13.83
น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	58.00	65.01	68.06
น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	43.20	48.06	39.17
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.99	2.20	2.53
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	96	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	4.54	4.64	0.43
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	17.29	13.96	6.38
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	47.31	51.04	35.31
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.02	0.02	0.002
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.08	0.07	0.03
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.21	0.25	0.14
อัตราการการเจริญเติบโตจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	0.06	0.05	0.02
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.02	0.01	0.001
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.08	0.03	0.01
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.21	0.11	0.06

4.3 ผลการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตบิวทานอล

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง เช่นกัน โดยค่าความเป็นกรดด่างจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อการสร้างตัวทำละลายในค่าความเข้มข้นต่างๆ ดังนั้นจึงทำการศึกษากระบวนการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยอาหารที่เตรียมได้ภายหลังการค่าเชื้อแล้วจะมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นประมาณ 6.5 เมื่อทำการถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมัก และปล่อยให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างอิสระ โดยยังไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตและสร้างกรดบิวทิริคและอะซิติคมากขึ้น มีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักลดต่ำลง จนถึงจุดที่กำหนด หลังจากนั้นจึงทำการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไม่ให้ต่ำกว่าจุดนั้นๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5, 5.0 และไม่ควบคุม ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.17-4.25

ผลการทดลองกระบวนการผลิตตัวทำละลายและกรด เมื่อมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 และ 4.18 เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของเชื้อคลอสตริเดียม พบว่า ในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก มีการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลจำนวนมาก เพื่อเจริญเติบโตและสร้างกรด ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น จนได้ความเข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ของการหมัก ขณะที่เชื้อมีการเจริญเติบโต จะมีการสร้างกรดบิวทิริคและอะซิติคด้วย ในระยะเวลานี้ ยังไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง จนค่าความเป็นกรดด่างลดลงถึงค่าที่กำหนด จึงเริ่มเข้าสู่การควบคุม ด้วยมีการเติมด่างลงไป เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโต พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างมีค่าต่ำ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียม ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ลดลงตามลำดับ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก ทำให้มีความเข้มข้นของเซลล์เพียง 0.65 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในระบบถึง 31.7 กรัมต่อลิตร และส่งผลให้มีผลได้กรดรวมเท่ากับ 34.07 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และมีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบเท่ากับ 3.78 และ 4.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

อย่างไรก็ดี เนื่องจากเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีการเจริญเติบโตและการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี จึงยังคงมีการผลิตตัวทำละลายเพิ่มขึ้นในระบบตามลำดับ โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 9.60 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.025 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 2.43 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยอะซิโตน บิวทานอล และเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.32, 0.89 และ 1.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและกรดของเชื้อคลอสตริเดียม ในสภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 4.19 และ 4.20 เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาล พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลส่วนใหญ่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสร้างกรดบิวทิริคและอะซิติค โดยให้รูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายกับการทดลองที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 โดยเชื้อมีการเจริญเติบโตไปจนได้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.94 กรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดด่างนี้ มีความไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ส่งผลทำให้การใช้น้ำตาล เพื่อสร้างกรดและตัวทำละลายได้ไม่สูงมาก และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในระบบสูงถึง 32.22 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้กรดรวมเท่ากับ 30.92 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และมีความเข้มข้นกรดรวมเหลือในระบบเท่ากับ 8.29 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยกรดบิวทิริคและอะซิติค 5.47 และ 2.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เนื่องจากการสร้างตัวทำละลายเกิดขึ้นน้อย ทำให้มีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 17.01 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมสูงสุดเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และให้ความเข้มข้นตัวทำละลายรวมเท่ากับ 4.56 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 0.06, 0.35 และ 4.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายและกรด ที่สภาวะไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.21 และ 4.22 เมื่อพิจารณารูปแบบการหมัก พบว่า มีรูปแบบคล้ายกระบวนการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และ 5.0 โดยมีการใช้น้ำตาลไปเพียง 27.09 กรัมต่อลิตร ในการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดเป็นส่วนใหญ่ มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.42 กรัมต่อลิตร

ส่วนการสร้างกรดนั้น พบว่า มีผลได้กรดรวมเท่ากับ 68.73 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.19 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และมีความเข้มข้นกรดรวมเหลือในระบบเท่ากับ 18.62 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยกรดบิวทิริคและอะซิติคที่ความเข้มข้น 7.60 และ 11.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จะเห็นว่า เชื้อมีความสามารถในการเปลี่ยนกรดบิวทิริคและอะซิติคเป็นตัวทำละลายยังไม่สูง ในสภาวะควบคุมดังกล่าว เนื่องจากมีปริมาณกรดทั้งสองเหลืออยู่ในระบบปริมาณมาก และให้ความเข้มข้นตัวทำละลายต่ำ โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 14.80 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 4.01 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.07, 1.11 และ 2.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

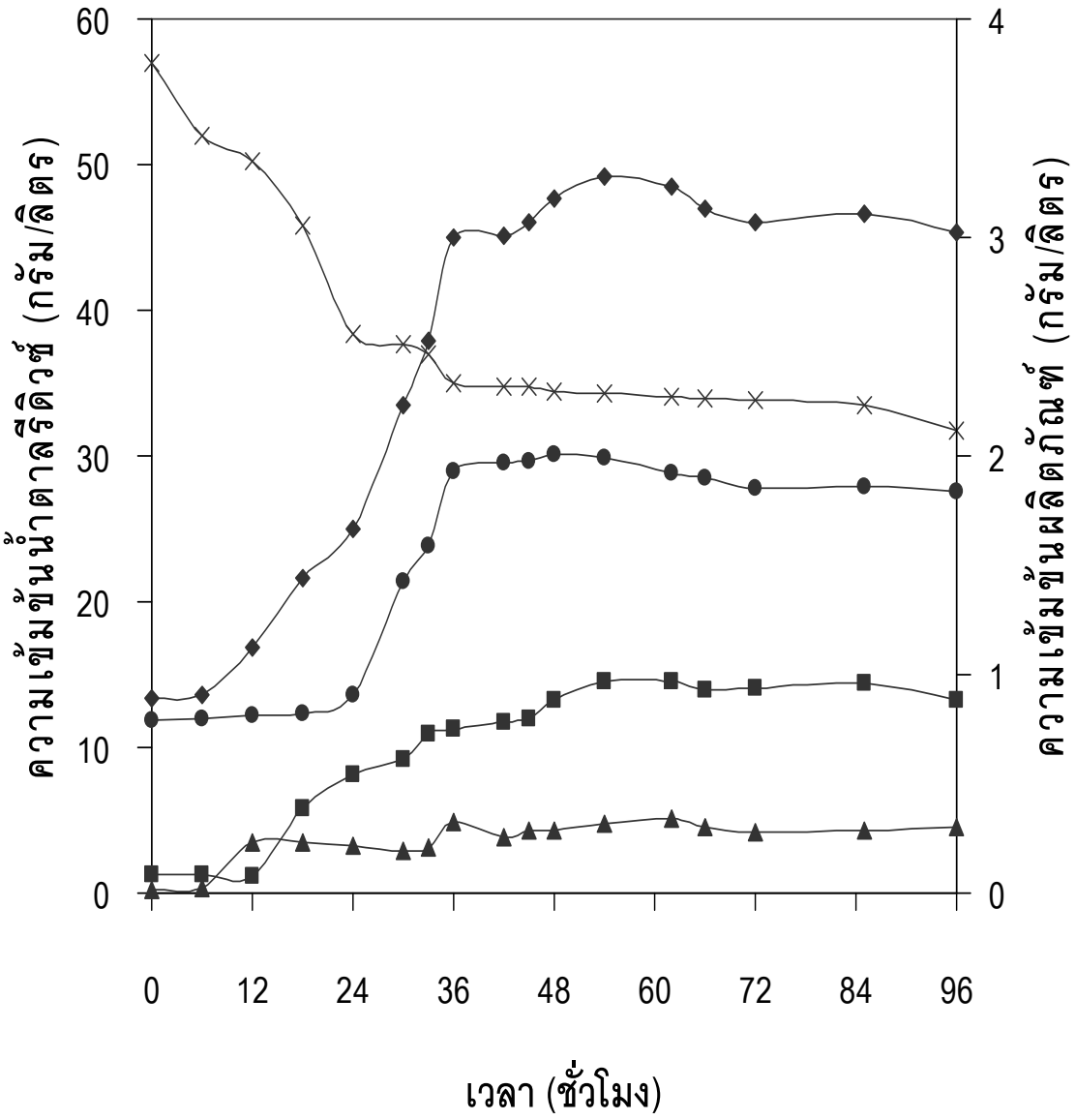
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ ระหว่างการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 4.5, 5.0 และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.23 และ 4.24 และตารางที่

4.3 พบว่า กระบวนการหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ผลิตตัวทำละลายรวมได้มากที่สุด โดยให้สัดส่วนของเอทานอลมากที่สุด และความเข้มข้นบิวทานอลที่ได้มีค่าต่ำ รองลงมาคือกระบวนการหมักที่ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ส่วนกระบวนการหมักโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ผลิตตัวทำละลายน้อยที่สุด

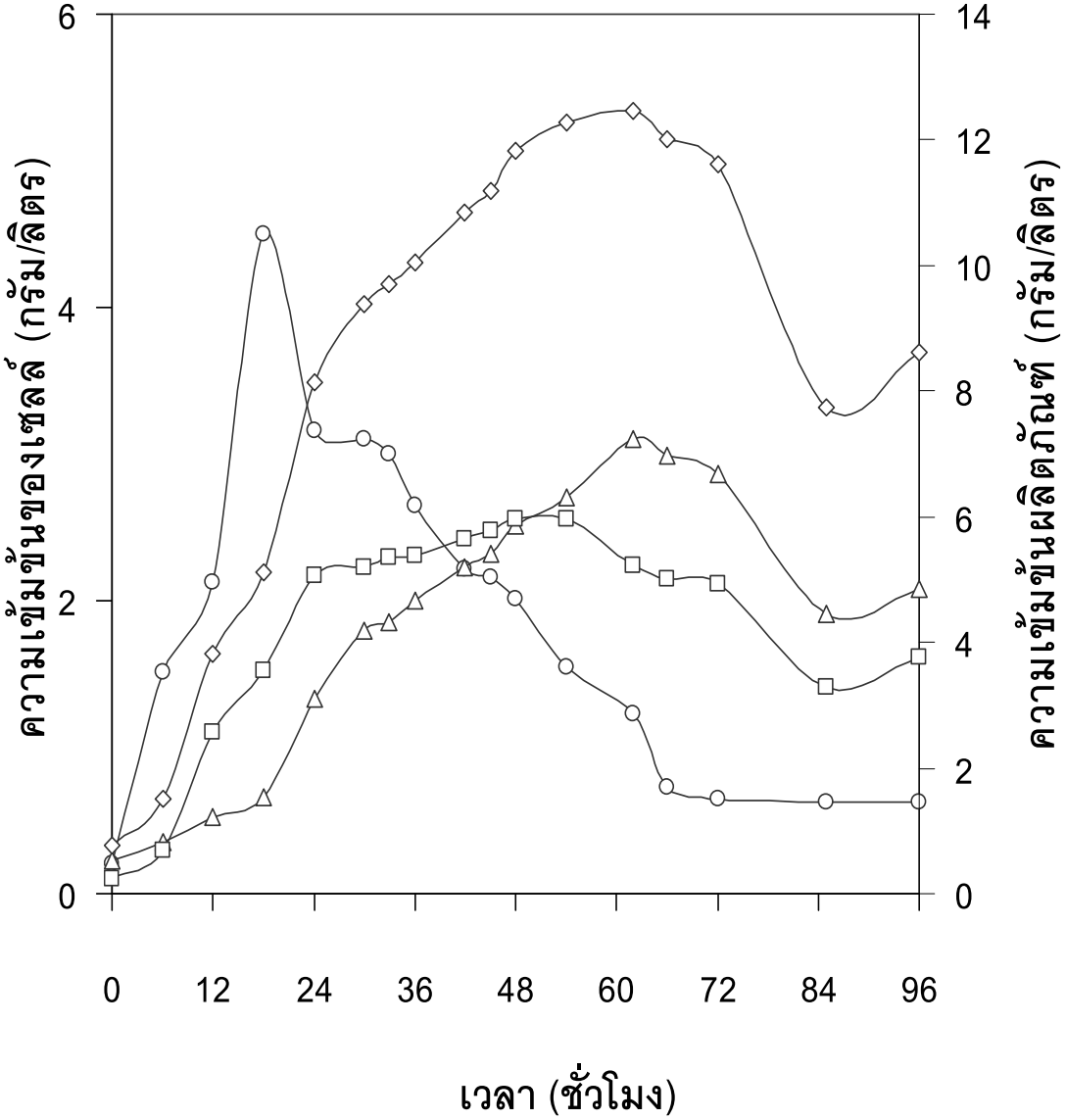
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 เมื่อมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5, 5.0, 5.5 และไม่ควบคุม พบว่า กระบวนการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 มีผลทำให้เชื้อคลอสตริเดียมผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุด และให้ความเข้มข้นกรดรวมที่เหลือในระบบสูง

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ และอัตราการผลิตกรดจำเพาะในแต่ละการทดลอง มาเปรียบเทียบกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.25 และสรุปผลการคำนวณในตารางที่ 4.3

กระบวนการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 4.5, 5.0 และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.17, 0.13 และ 0.20 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะเท่ากับ 0.006, 0.02 และ 0.02 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดจำเพาะมีค่ามากกว่าอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ โดยมีค่าเท่ากับ 0.02, 0.03 และ 0.08 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ



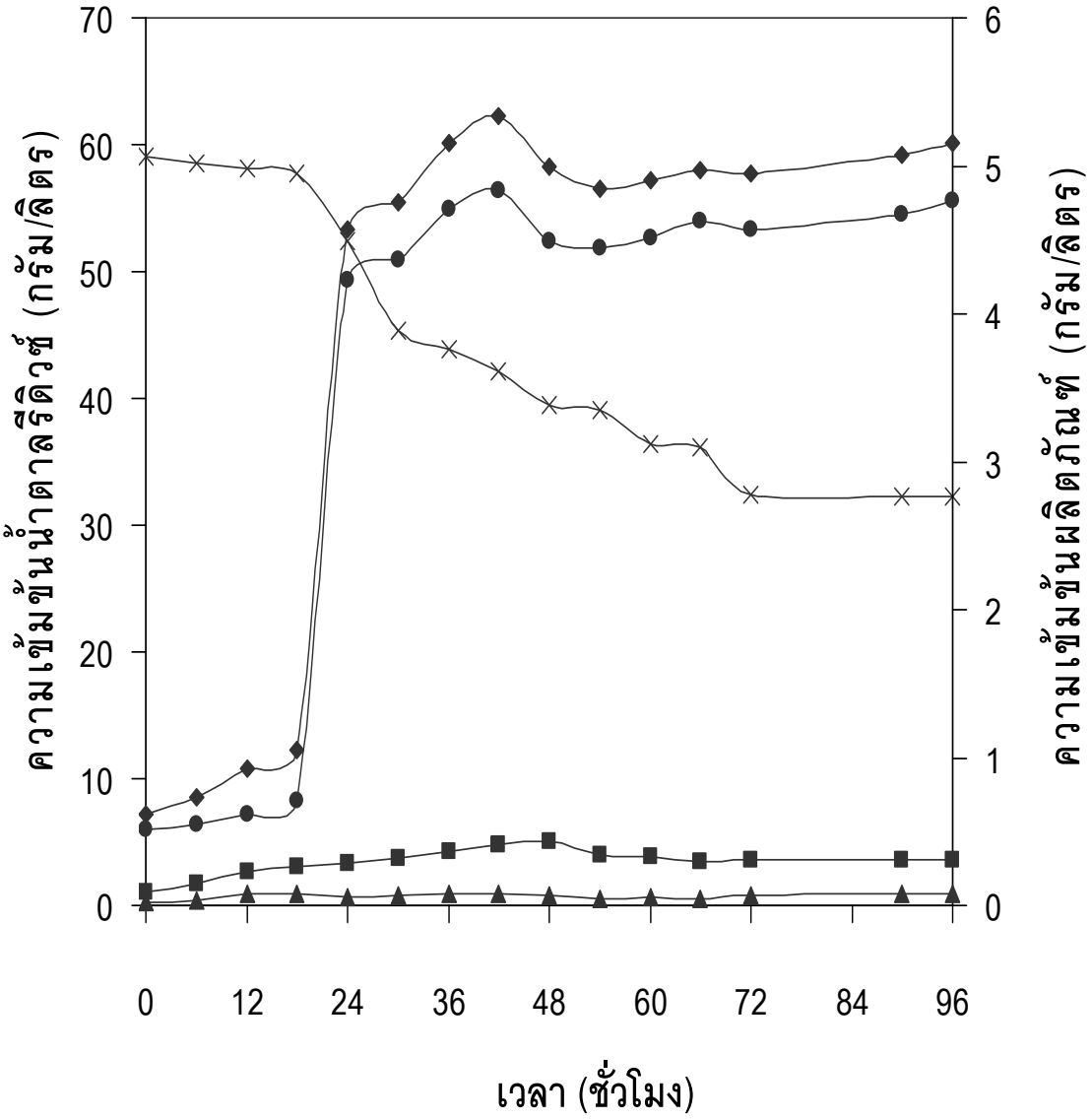
รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 4.5



รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

○เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม

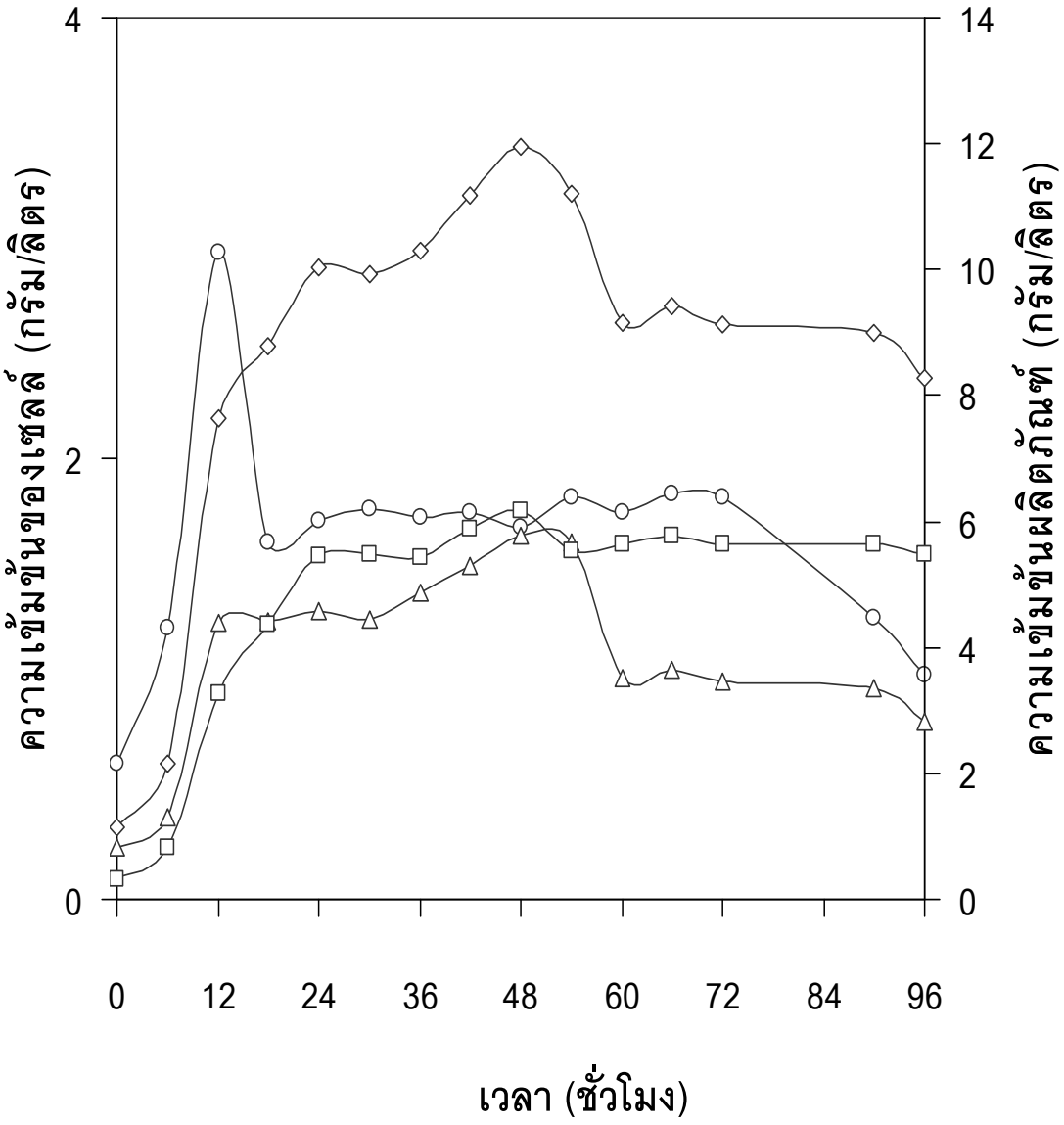


รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

X น้ำตาลรีดิวซ์ ▲ อะซิโตน

■ บิวทานอล ● เอทานอล

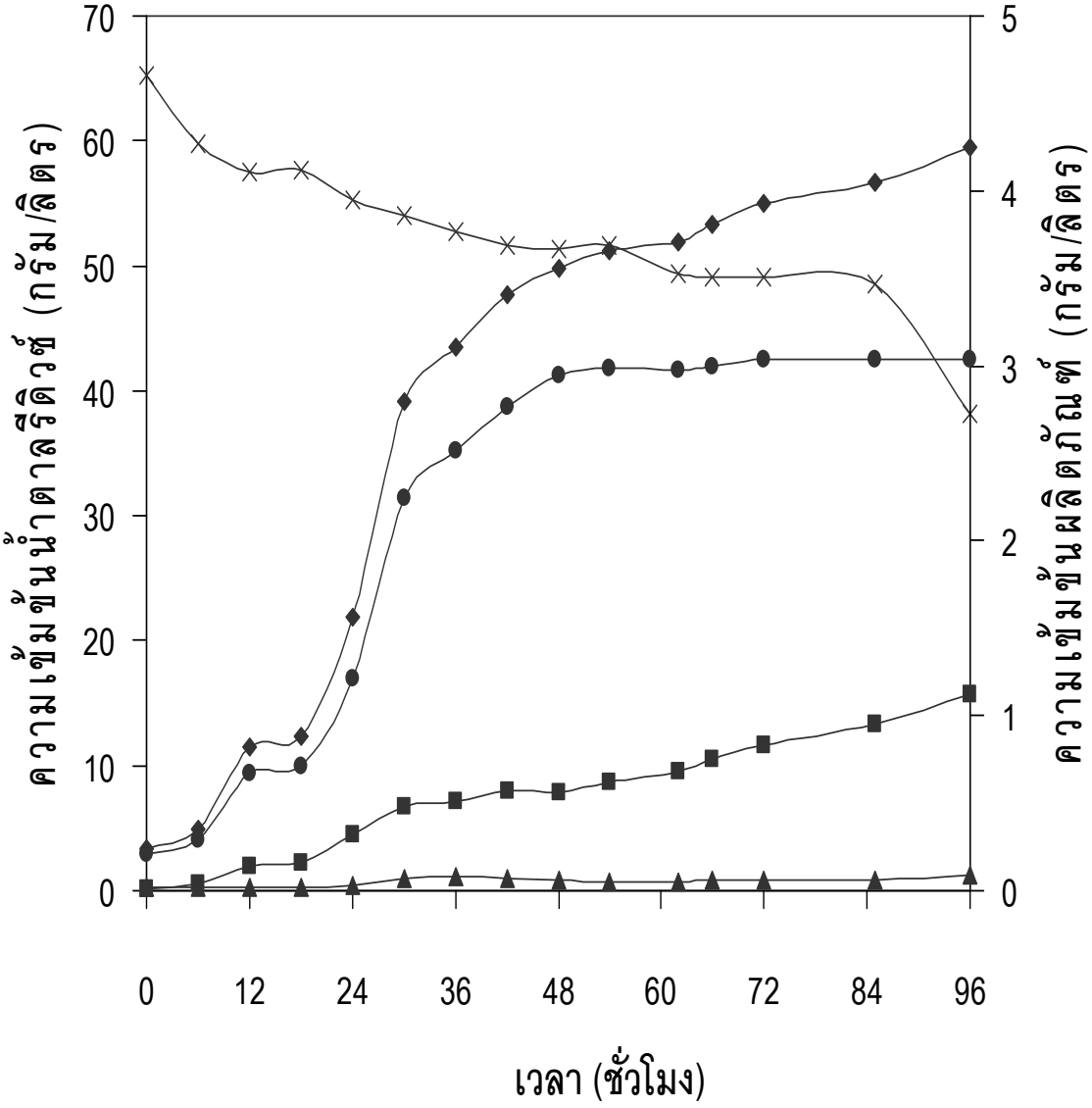
◆ ตัวทำละลายรวม



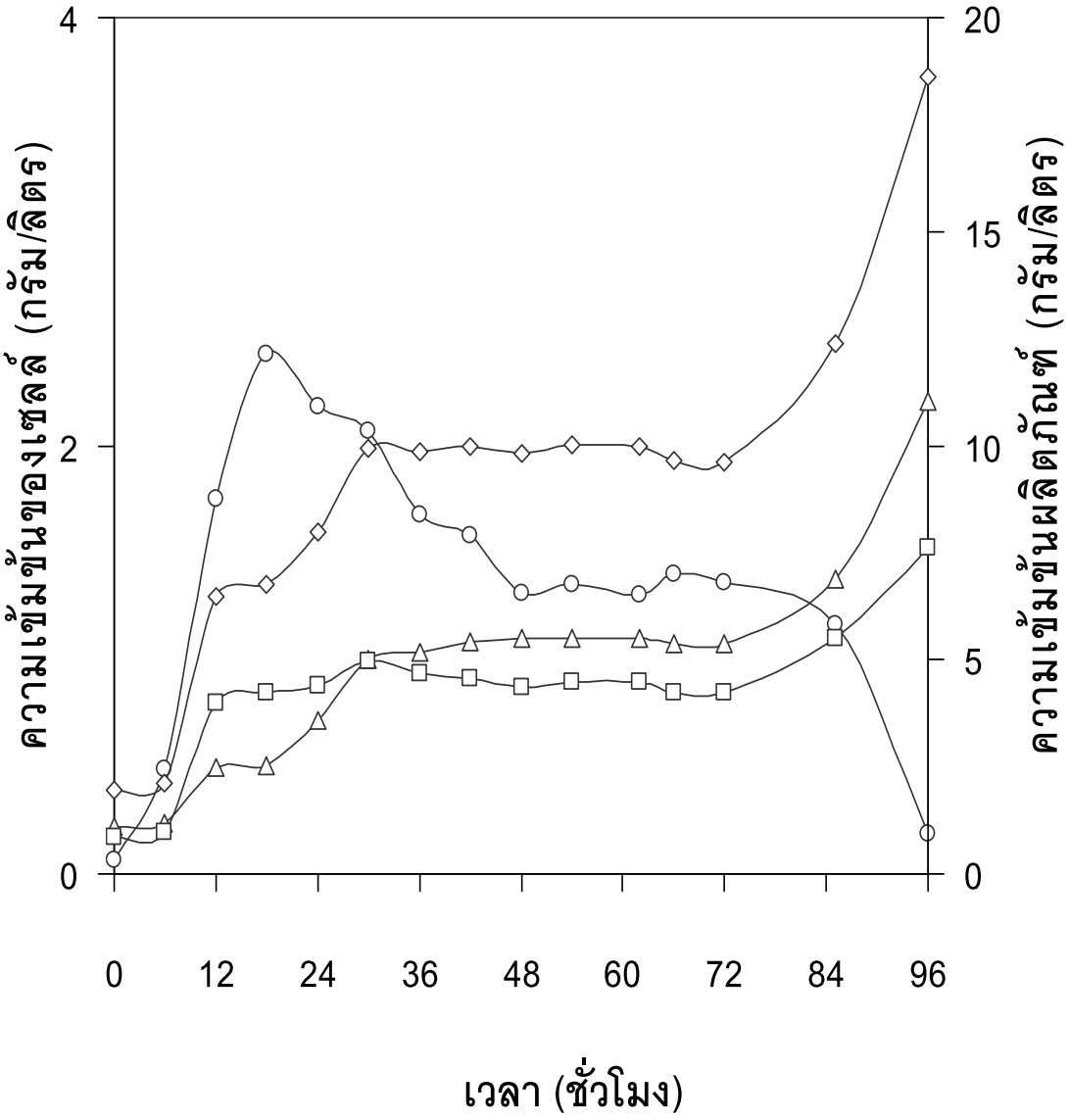
รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



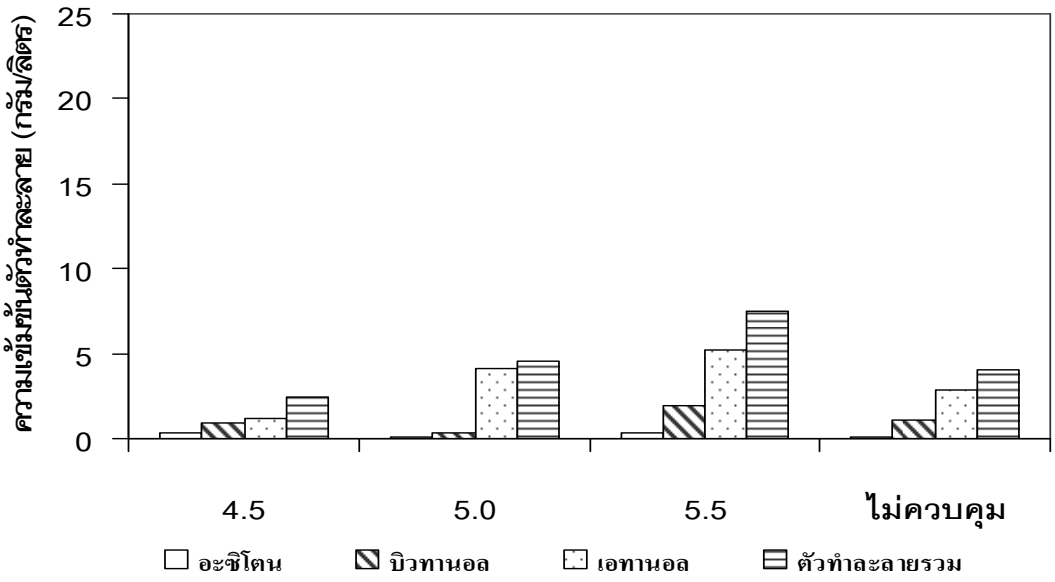
รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง



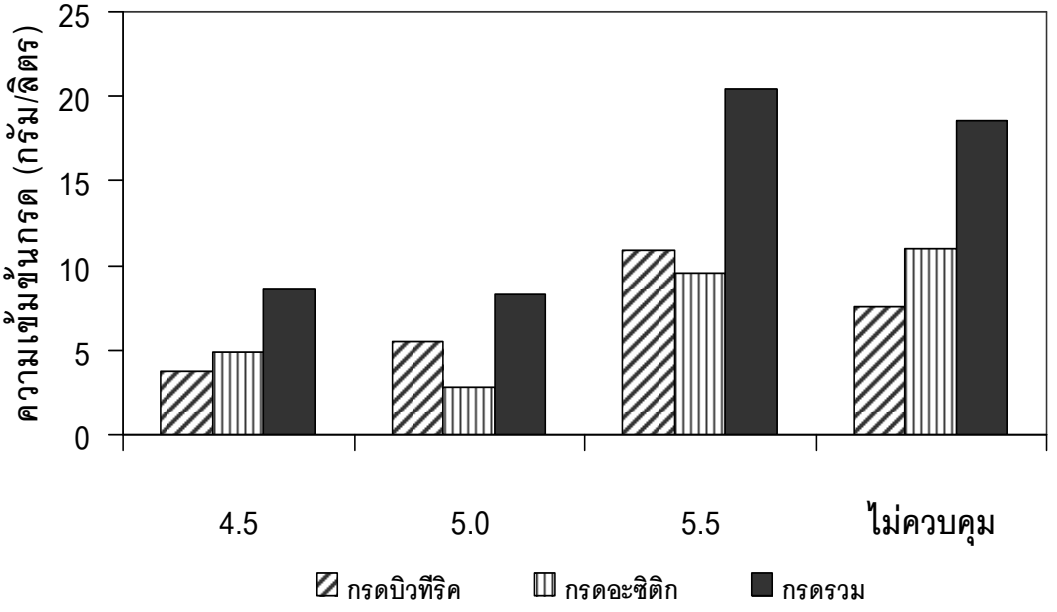
รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

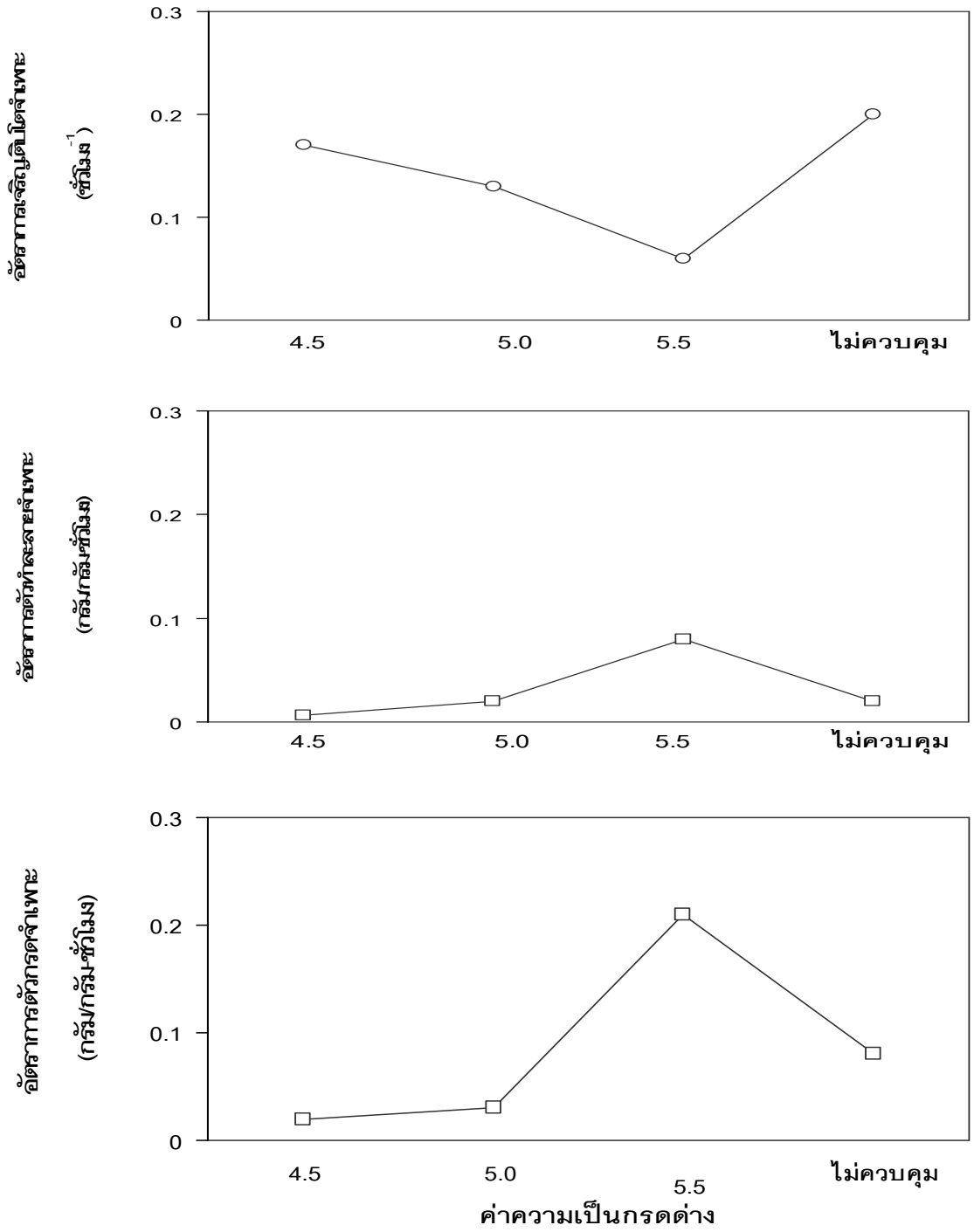
□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.23 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตตัวทำละลายโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.24 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรด โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.25 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ □ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ

Δ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ

ตารางที่ 4.3 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 1 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวว์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตัวแปร	ค่าความเป็นกรดด่าง			
	4.5	5.0	5.5	ไม่ควบคุม
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	0.32	0.06	0.31	0.07
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.89	0.35	1.96	1.11
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	1.22	4.15	5.2	2.83
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	2.43	4.56	7.47	4.01
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	3.78	5.47	10.88	7.60
กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	4.84	2.82	9.56	11.02
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	8.62	8.29	20.44	18.62
น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	57	59.03	58	65.28
น้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	25.3	26.81	43.2	27.09
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	4.5	2.94	0.99	2.42
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	96	96	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	3.52	1.30	4.54	4.10
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	9.60	17.01	17.29	14.80
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	34.07	30.92	47.31	68.73
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.009	0.004	0.02	0.01
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.03	0.05	0.08	0.04
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.09	0.09	0.27	0.19
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	0.17	0.13	0.06	0.20
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.002	0.001	0.02	0.005
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.006	0.02	0.08	0.02
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.02	0.03	0.21	0.08

จากผลการทดลองในส่วนนี้ทั้งหมด (ผลการทดลองข้อ 4.1-4.3) สรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล คือ กระบวนการหมักน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C.acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

จากการทดลอง จะเห็นว่า การผลิตตัวทำละลายที่ผลิตได้ยังคงมีความเข้มข้นต่ำ และมีความเข้มข้นกรดรวมที่เหลือในระบบมีค่าสูง ซึ่งจากวิถีชีวเคมีของการหมัก โดยใช้เชื้อสายพันธุ์คลอสตริเดียมนั้น ส่วนมากกรดบิวทิริคและอะซิติคที่ผลิตขึ้น จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวทำละลายอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลเกือบทั้งหมด และทำให้มีความเข้มข้นกรดบิวทิริคและอะซิติคที่เหลือในระบบมีค่าต่ำ แต่ในการทดลองที่ผ่านมา ไม่เป็นไปตามนั้น ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายลดลง หรือสภาวะของการหมักไม่เหมาะสม เช่น ความเข้มข้นของสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น

ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมในปัจจัยส่วนอื่นๆ ที่มีผลต่อการหมักเพื่อผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล จากน้ำอ้อยของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยการเปลี่ยนสูตรสารอาหารที่ใช้ในการหมักจากอาหารสูตรที่ 1 เป็นอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงและผลของกระบวนการหมักที่เกิดขึ้น รวมทั้งประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต่อไป

4.4 ผลการศึกษาผลของสูตรสารอาหารต่อการผลิตบิวทานอล

กระบวนการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอลจากสารอาหารน้ำอ้อย โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก [4] พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างกรดอะซิติคและบิวทิริคได้สูง แต่ไม่สามารถเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายรวมที่ได้มีค่าต่ำ จึงทำการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารในการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 ที่ได้จากงานวิจัยของ Tashiro และคณะ ปี 2004 ซึ่งมีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจน คือ ทริปโทนและแอมโมเนียมอะซิเตต ร่วมกับการใช้ยีสต์สกัด และปรับความเข้มข้น ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก [7] ทำการหมักในสภาวะเดียวกัน คือ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร และควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ผลการศึกษากระบวนการหมักน้ำอ้อยในอาหารสูตรที่ 2 แสดงดังรูปที่ 4.26 และ 4.27 เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีการปรับตัวให้เข้ากับ

อาหาร (lag phase) ประมาณ 12 ชั่วโมงของการหมัก และมีระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) ที่นานกว่าการใช้อาหารสูตรที่ 1 ประมาณ 24 ชั่วโมง ในช่วงนี้กรดบิวทิริคและอะซิติคถูกสร้างขึ้นในความเข้มข้นที่สูง โดยมีค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 9.0 และ 10.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมง 18 และ 24 ของการหมัก หลังจากนั้นเชื้อคลอสตริเดียม มีการใช้กรดที่ผลิตขึ้น ร่วมกับการใช้น้ำตาลในการผลิตตัวทำละลาย ทำให้ความเข้มข้นของกรดบิวทิริคและอะซิติคลดลงจนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.79 และ 3.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของตัวทำละลาย โดยความเข้มข้นของบิวทานอลเพิ่มขึ้นจาก 0.76 กรัมต่อลิตร เป็น 2.38 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นอะซิโตนเพิ่มขึ้นจาก 0.07 กรัมต่อลิตร เป็น 0.97 กรัมต่อลิตร ส่วนเอทานอลจะผลิตอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจึง มีค่าคงที่จนสิ้นสุดการหมัก

หลังจาก 48 ชั่วโมง ของการหมัก มีการใช้น้ำตาลอีกครั้ง ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นกรดอะซิติคและบิวทิริคที่เพิ่มขึ้น จากนั้นกรดที่ผลิตได้นี้ร่วมกับน้ำตาลที่เหลืออยู่ถูกเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายต่อไป และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีน้ำตาลเหลือในระบบเพียง 3.91 กรัมต่อลิตร เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นมีค่าไม่สูงเพียงพอ สำหรับการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย ทำให้มีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบ 7.62 และ 3.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีผลได้กรดรวมเท่ากับ 22.37เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง

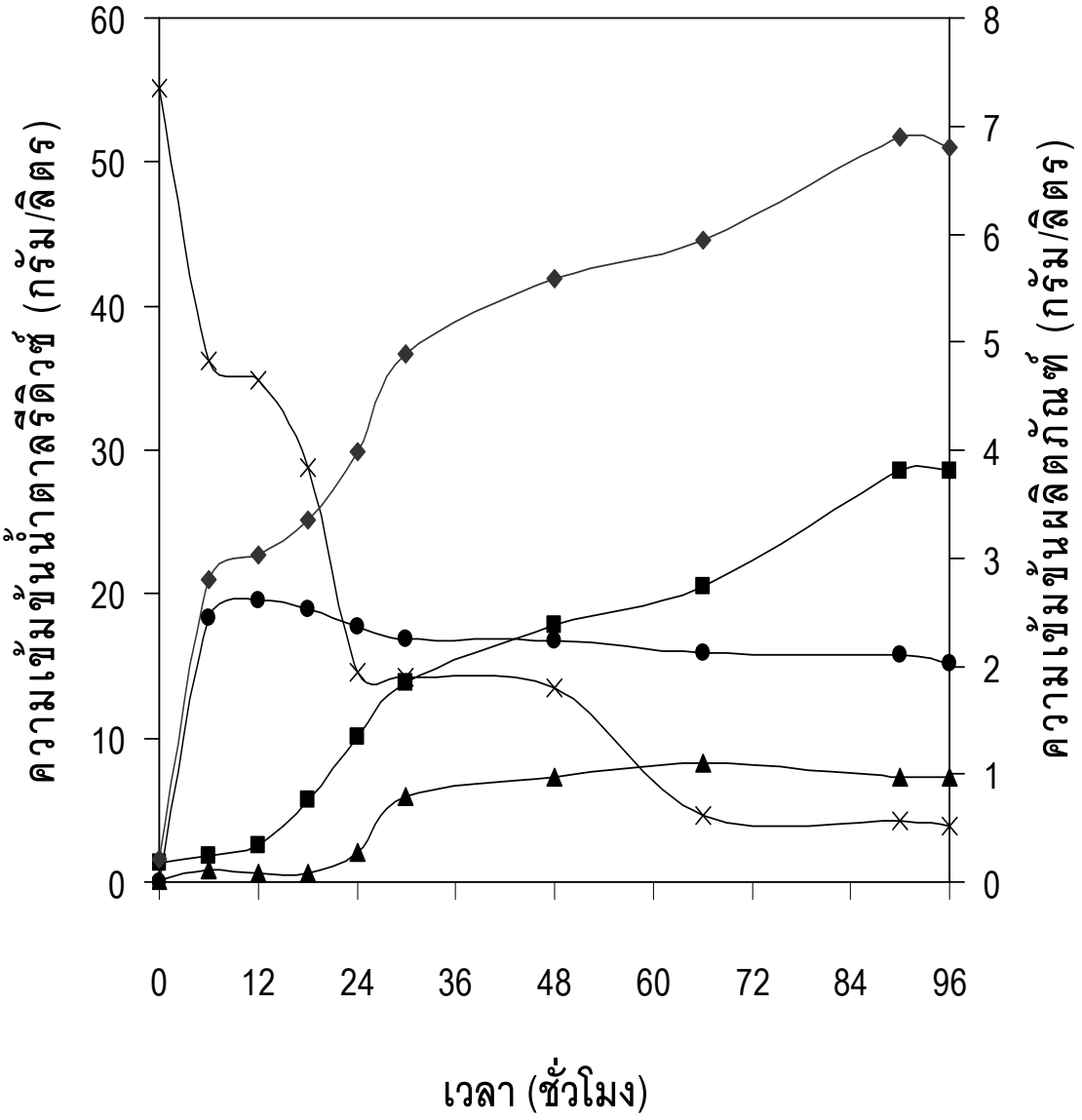
อย่างไรก็ดี ความเข้มข้นของตัวทำละลายมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 14.67 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 7.51 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 1.09, 3.81 และ 2.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 4.28 และ 4.29 และตารางที่ 4.4 พบว่ากระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 นั้นเชื้อคลอสตริเดียมมีการใช้น้ำตาลได้ดีกว่า และผลิตตัวทำละลายรวมในความเข้มข้นสูงกว่าเมื่อใช้อาหารสูตรที่ 1 ประมาณ 1.6 เท่า โดยให้ความเข้มข้นบิวทานอลและอะซิโตนมากกว่า 11 เท่า และ 18 เท่า ตามลำดับ และความเข้มข้นเอทานอลลดลง 1.6 เท่า

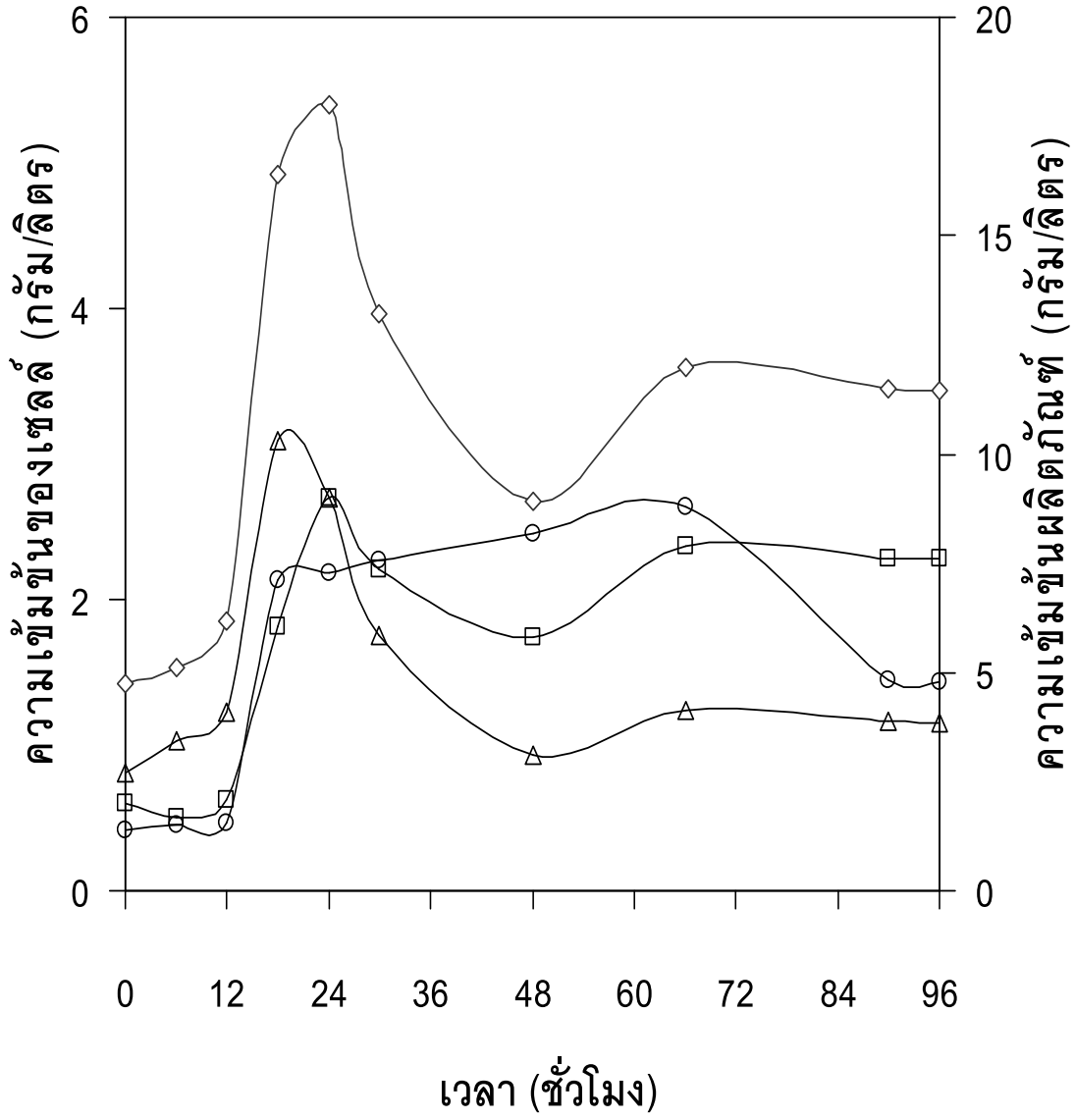
จากผลที่ได้ในการทดลอง แสดงให้เห็นว่า อาหารสูตรที่ 2 มีส่วนส่งเสริมทำให้การสร้างกรดและการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพดีขึ้นอย่างเด่นชัด อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของทริปโทนที่มีโพลีเปปไทด์และกรดอะมิโนจำนวนมาก ที่ได้จากการย่อยสลายนมด้วยเอนไซม์ รวมทั้งแอมโมเนียมอะซิเตตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีผลทำให้วิถีของเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างตัวทำละลายสมบูรณ์ขึ้น

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจนล์ศาสตร์ของการหมัก พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ และอัตราการผลิตกรดจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.25 ชั่วโมง$^{-1}$, 0.03 และ 0.05 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 ดังแสดงในรูปที่ 4.30 และตารางที่ 4.4 พบว่ากระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 มีประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่ากระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 เนื่องจากมีค่าจนล์ศาสตร์ทั้งหมดสูงกว่า

เนื่องจาก กระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 ยังมีกรดบิวทิริคเหลือในระบบมากกว่ากระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 ถ้ามีการเปลี่ยนกรดบิวทิริคเป็นบิวทานอลอย่างสมบูรณ์จะได้ความเข้มข้นบิวทานอลประมาณ 11 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงควรเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ในการทดลองต่อไป



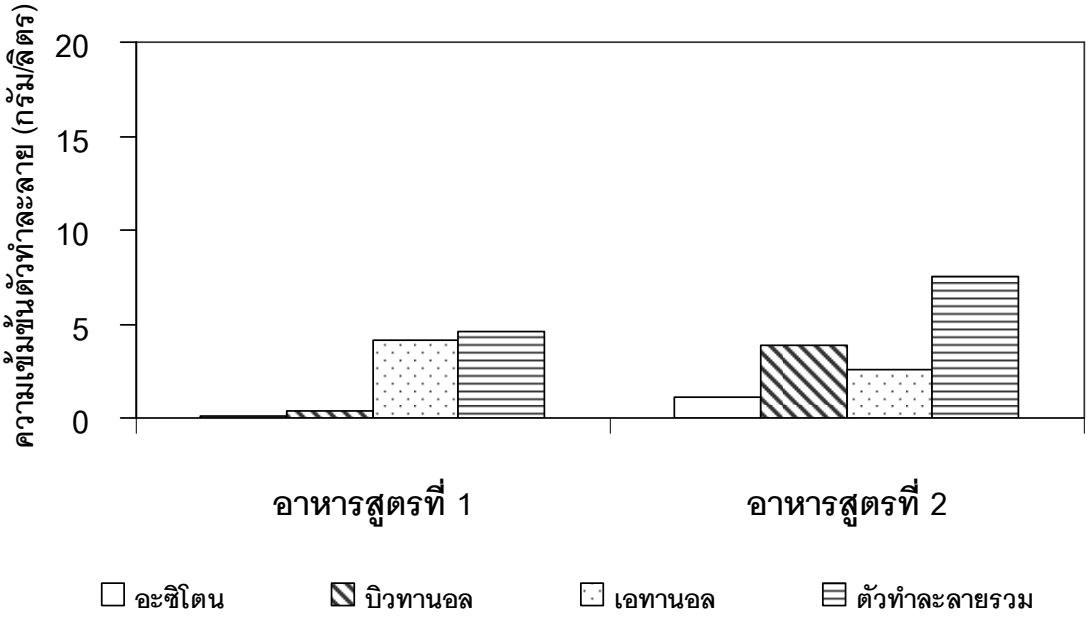
รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



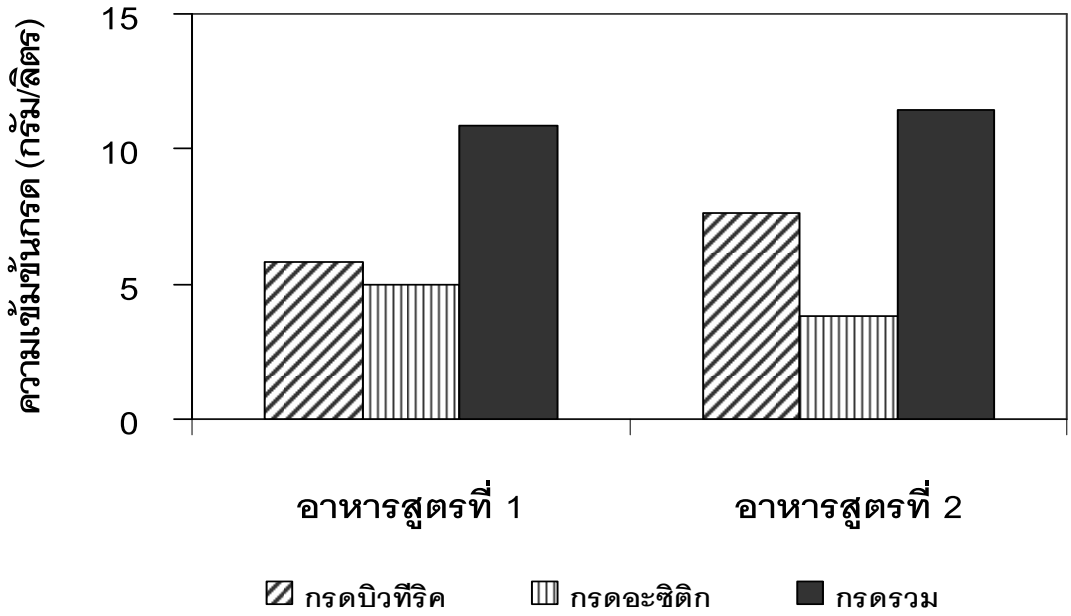
รูปที่ 4.27 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

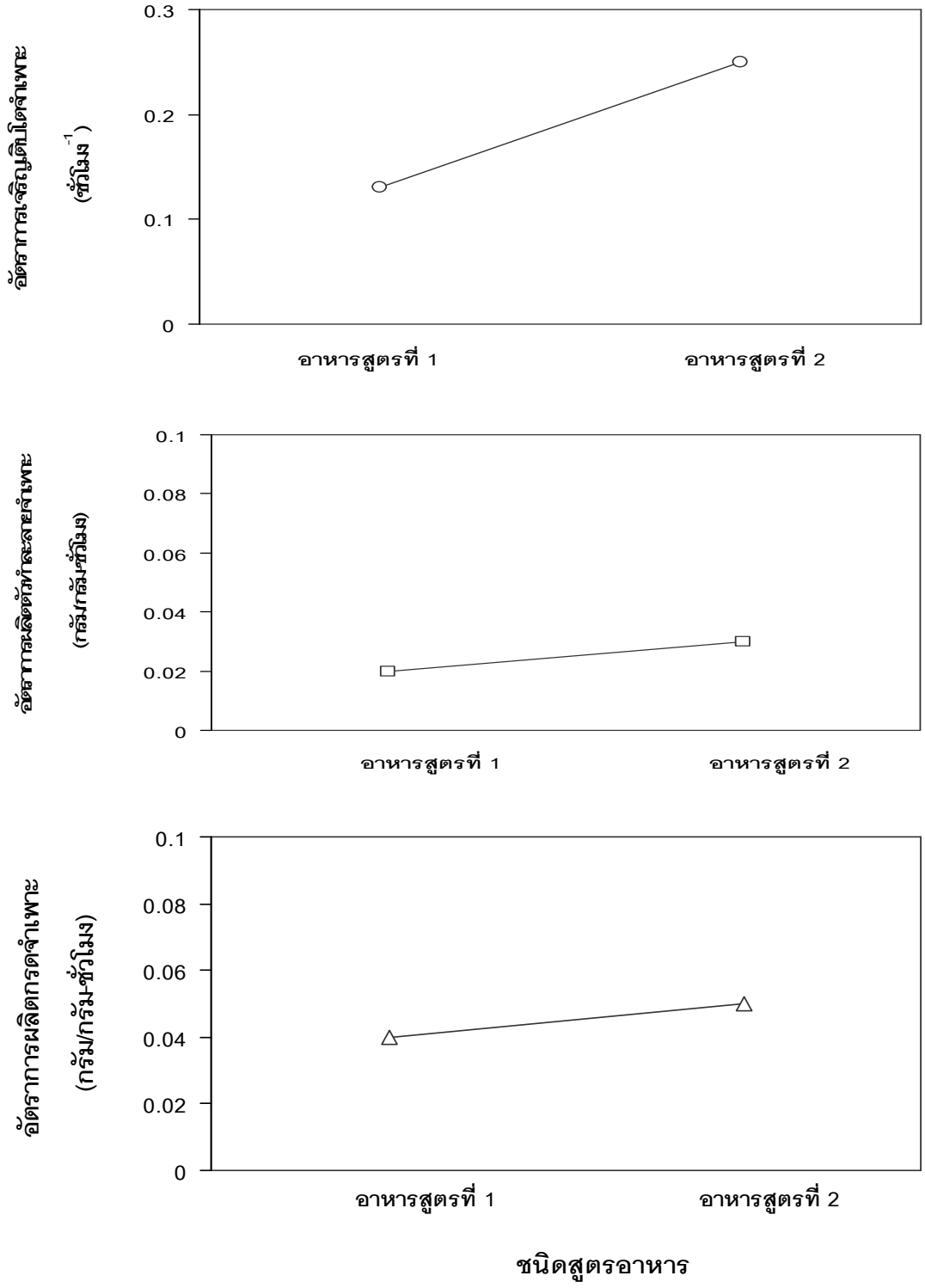
□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.28 ผลของสูตรอาหารต่อการผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.29 ผลของสูตรอาหารต่อการผลิตกรดจากน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.30 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักจากอาหารสูตรต่างๆ

○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ □ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ

Δ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ

ตารางที่ 4.4 ผลของสูตรอาหารต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมักน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	อาหารสูตรที่ 1 [3,4]	อาหารสูตรที่ 2 [7]
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	0.06	1.09
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	0.35	3.81
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	4.15	2.61
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	4.56	7.51
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	5.85	7.62
กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	4.98	3.83
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	10.83	11.45
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	59.03	55.09
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	26.81	51.18
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	2.94	2.64
ระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)	96	96
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	1.30	7.44
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	17.01	14.67
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	40.40	22.37
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.004	0.04
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.05	0.08
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.11	0.12
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	0.13	0.25
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.001	0.01
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.02	0.03
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.04	0.05

4.5 ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตบิวทานอล

การทดลองศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตตัวทำละลายในการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 โดยการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0

ผลการศึกษากระบวนการหมักน้ำอ้อย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.31 และ 4.32 เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีระยะปรับตัว (lag phase) ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และให้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก โดยมีการผลิตกรดบิวทิริคและอะซิติคในความเข้มข้นที่สูงมากในช่วงเวลานี้ ทำให้มีผลได้กรดรวมเท่ากับ 18.64 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงมีการใช้กรดที่ผลิตขึ้น ร่วมกับการใช้น้ำตาลในการสร้างตัวทำละลาย สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของความเข้มข้นตัวทำละลาย

เนื่องจากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นมีค่าไม่สูง ดังนั้นจึงทำให้มีการใช้น้ำตาลหมดก่อนขั้นตอนการเปลี่ยนกรดทั้งหมดเป็นตัวทำละลาย ทำให้ความเข้มข้นตัวทำละลายที่ผลิตได้ มีค่าไม่สูงมากนัก โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 18.71 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมสูงสุดเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 7.98 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 1.24, 3.16 และ 3.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งมีความเข้มข้นของกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบ 3.62 และ 4.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ส่วนผลการศึกษากระบวนการหมักในอาหารสูตรที่ 2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.33 และ 4.34 เมื่อพิจารณารูปแบบการหมัก พบว่า มีการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโต พร้อมกับการผลิตกรดจำนวนมาก เช่นกัน โดยความเข้มข้นกรดอะซิติคและบิวทิริคสูงสุดเท่ากับ 10.66 และ 7.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 30 ของการหมัก ตามลำดับ หลังจากนั้น มีการใช้กรดที่สร้างขึ้นร่วมกับการใช้น้ำตาล เพื่อการสร้างตัวทำละลาย ทำให้ความเข้มข้นกรดบิวทิริคและอะซิตกมีค่าลดลง

จากการลดลงของกรดบิวทิริคและอะซิติค มีความสัมพันธ์กับการผลิตตัวทำละลาย จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของตัวทำละลายเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีความเข้มข้นของบิวทานอลเพิ่มขึ้นจาก 1.88 กรัมต่อลิตร เป็น 13.65 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 ขณะที่ความเข้มข้นของอะซิโตนเพิ่มขึ้นจาก 0.48 เป็น 3.82 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 66 ของการหมัก ส่วนการผลิตเอ

ทานอลจะเกิดก่อนการผลิตตัวทำละลายอื่นๆ โดยมีความเข้มข้นสูงสุด 3.62 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก หลังจากนั้นมีค่าคงที่ตลอดการหมัก

การเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียมเกิดขึ้นได้ดีและมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 3.55 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 54 เมื่อมีบิวทานอลในความเข้มข้นที่มาก ความเข้มข้นเซลล์ในระบบจะลดลงตามลำดับ เนื่องจากบิวทานอลและตัวทำละลายที่ความเข้มข้นสูง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น มีเพียงพอที่จะเปลี่ยนกรดทั้งหมดให้เป็นตัวทำละลาย ทำให้มีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือในระบบ 1.26 และ 1.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีน้ำตาลถูกใช้ไปเหลือเพียง 0.71 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมัก

ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการหมักเป็นอย่างดี เพราะ น้ำตาลรีดิวซ์และกรดบิวทิริคและกรดอะซิติคถูกใช้ไปจนเกือบหมด ทำให้ได้ความเข้มข้นตัวทำละลายสูง โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 32.67 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 24.73 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 4.58, 15.35 และ 4.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการศึกษากระบวนการหมักในอาหารสูตรที่ 2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.35 และ 4.36 เมื่อพิจารณารูปแบบการหมัก พบว่า เชื้อคลอสตริเดียมมีระยะการปรับตัวนานถึง 48 ชั่วโมง และยังคงมีการใช้น้ำตาลจำนวนมากในการเจริญเติบโตพร้อมกับการผลิตกรด จนถึงชั่วโมงที่ 120 ของการหมัก ให้ความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.92 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นกรดบิวทิริคและอะซิติคสูงสุดเท่ากับ 5.08 และ 2.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีผลได้กรดรวมเท่ากับ 5.87 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดรวมเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง สัมพันธ์กับการผลิตบิวทานอลและอะซิโตน ซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยความเข้มข้นของบิวทานอลเพิ่มขึ้นจาก 0.09 กรัมต่อลิตร เป็น 11.55 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นของ อะซิโตนเพิ่มขึ้นจาก 0.05 เป็น 6.04 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ส่วนการผลิตเอทานอลจะเกิดขึ้นตั้งแต่ 30 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้น มีค่าคงที่ตลอดการหมัก โดยมีผลได้ตัวทำละลายรวมเท่ากับ 26.87 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมสูงสุดเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง และผลิตตัวทำละลายรวมได้ 22.75 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล 6.04, 12.75 และ 3.96 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

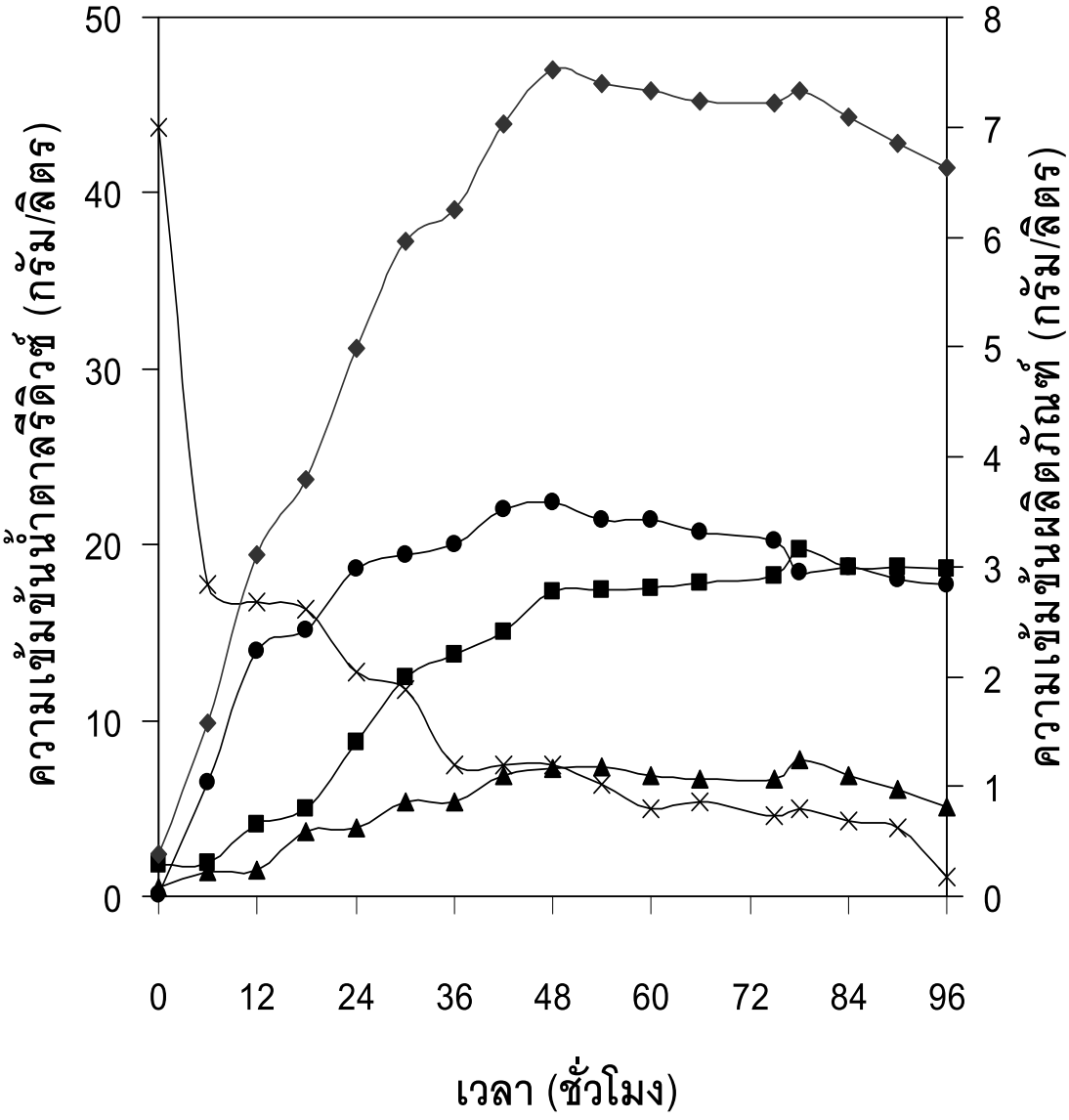
แต่เนื่องจาก ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นมีค่าสูงถึง 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงเกินไป ส่งผลให้มีน้ำตาลเหลือในระบบถึง 11.63 กรัมต่อลิตร มีกรดบิวทิริคและอะซิติคเหลือเพียง 1.48 และ

1.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ประกอบกับความเข้มข้นตัวทำละลายที่สูงในขณะนั้น ทำให้มีผลยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ ให้เข้าสู่สภาวะการสร้างสปอร์

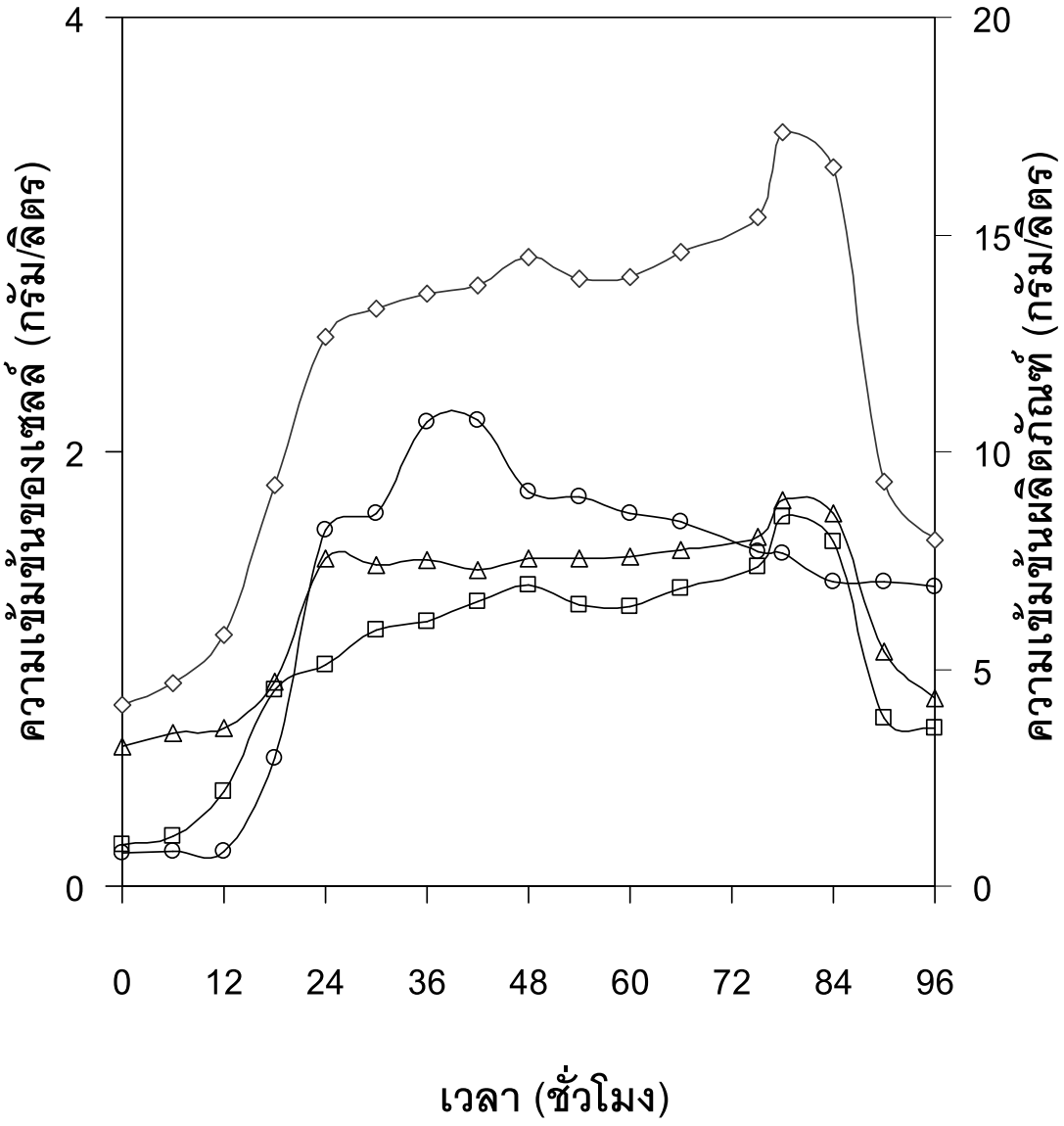
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.37 และ 4.38 และตารางที่ 4.5 พบว่า การหมักโดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการหมักที่สุด เนื่องจากให้ความเข้มข้นตัวทำละลายมากที่สุด แต่ค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกับการหมักที่ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ความเข้มข้นของอะซิโตนมากกว่า ส่วนการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตตัวทำละลายได้น้อยที่สุด และมีความเข้มข้นกรดรวมเหลือในระบบสูง

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าจนล์ศาสตร์ และเปรียบเทียบผล ดังแสดงในรูปที่ 4.39 และตารางที่ 4.5 พบว่า กระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรที่ 2 ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.11, 0.15 และ 0.04 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ และมีค่าอัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะเท่ากับ 0.04, 0.009 และ 0.009 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.04, 0.07 และ 0.04 กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตกรดจำเพาะในทั้งสามสภาวะ

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การใช้อาหารสูตรที่ 2 มีความเหมาะสมต่อการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล โดยเชื้อ *C.acetobutylicum* ATCC 824 และสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก คือ กระบวนการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



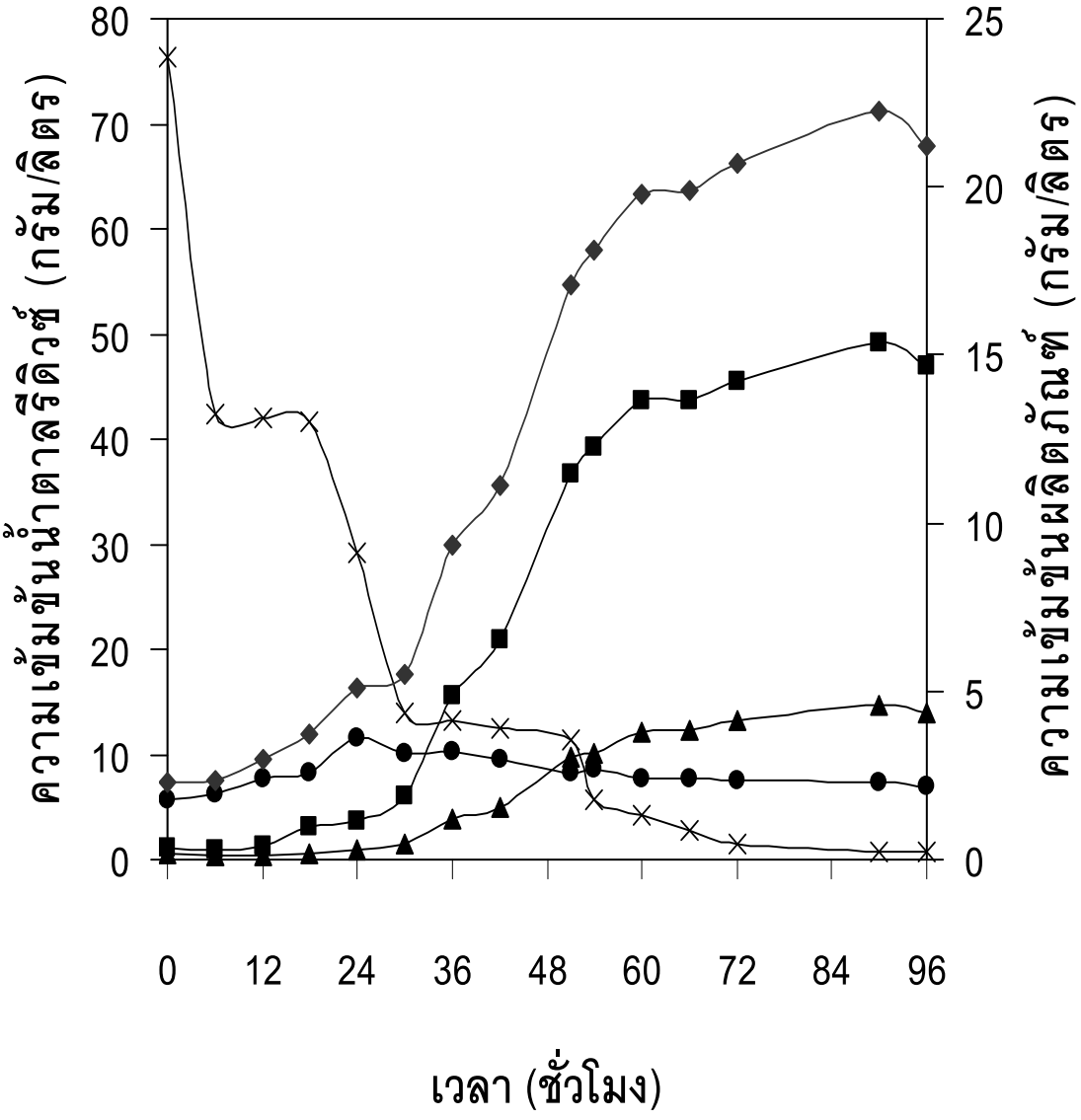
รูปที่ 4.31 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



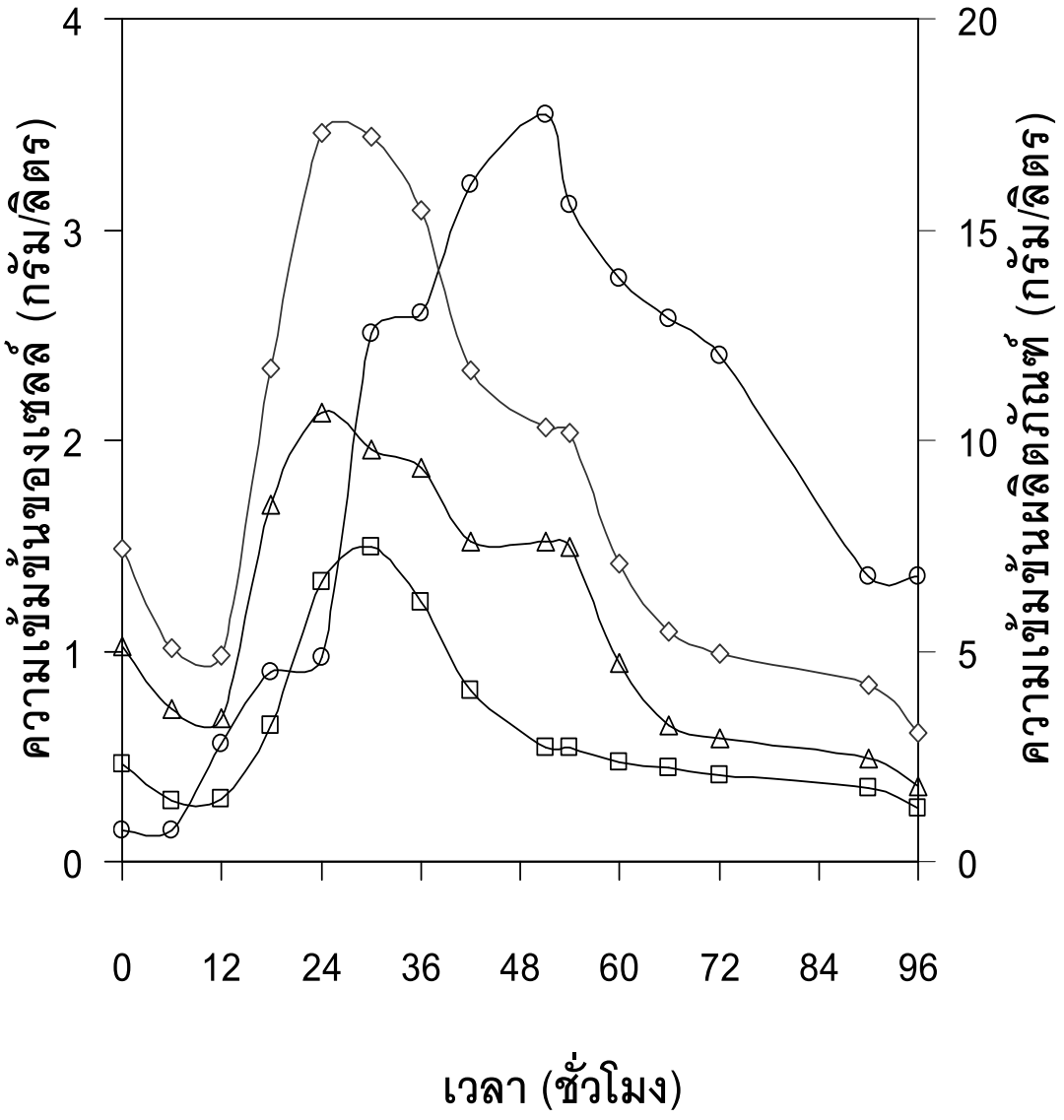
รูปที่ 4.32 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 45 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



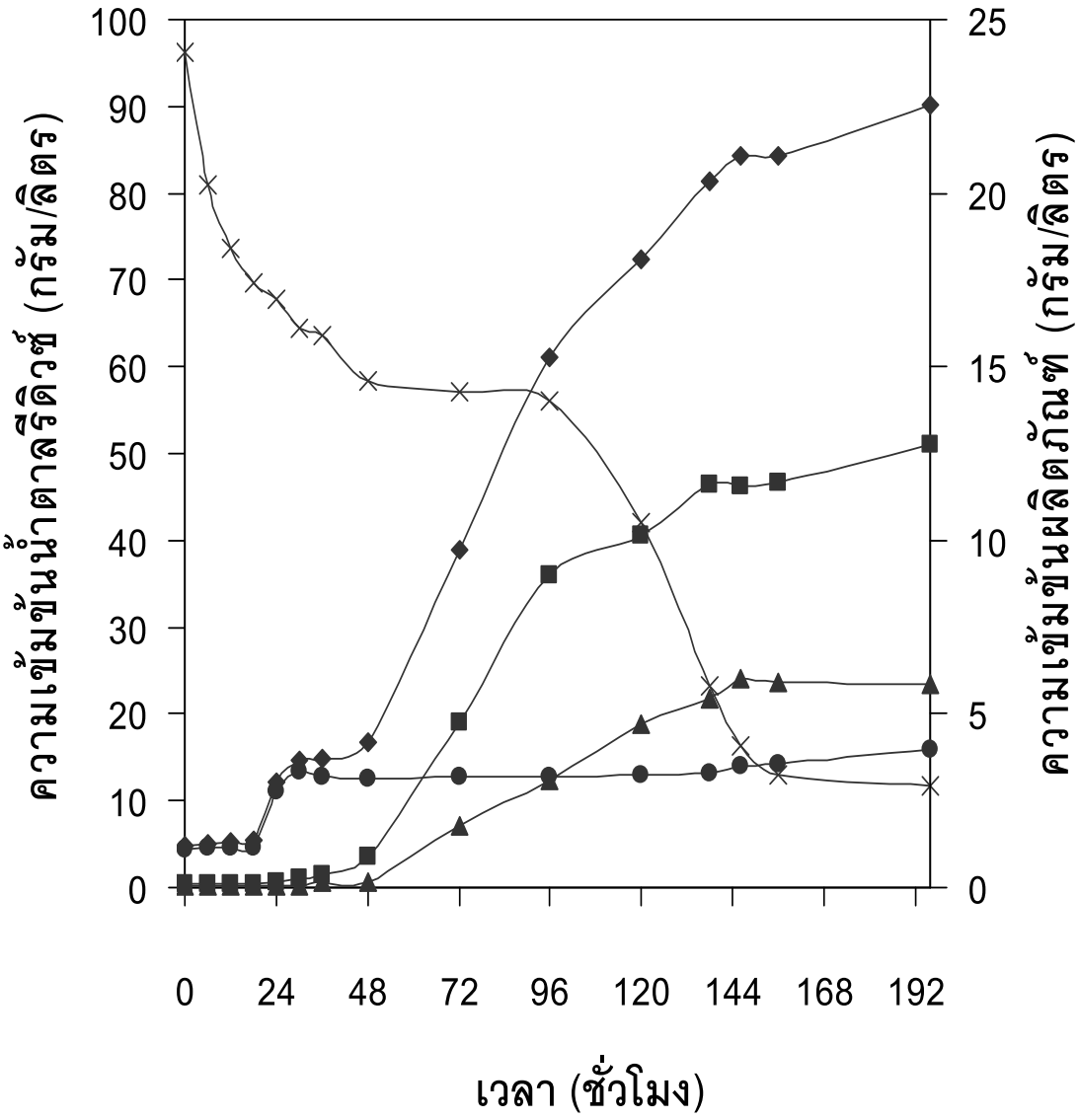
รูปที่ 4.33 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



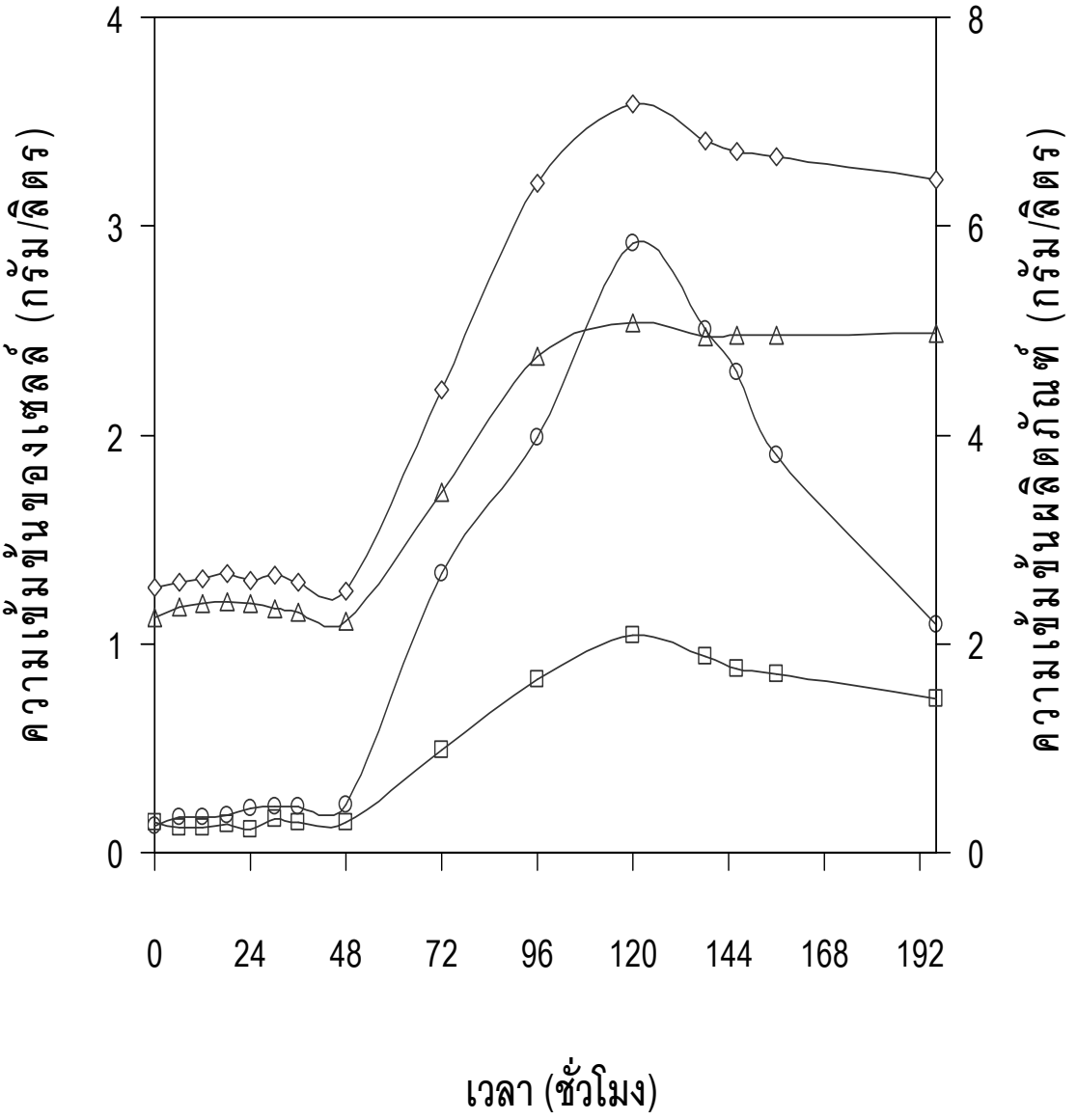
รูปที่ 4.34 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○ เซลล์ Δ กรดอะซิติค

□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



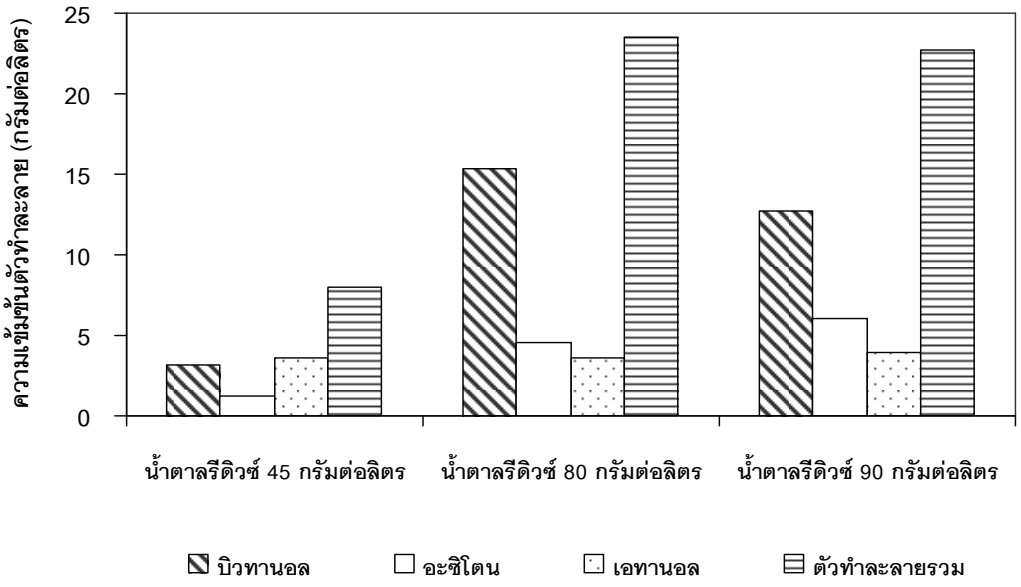
รูปที่ 4.35 ความเข้มข้นตัวทำละลายและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



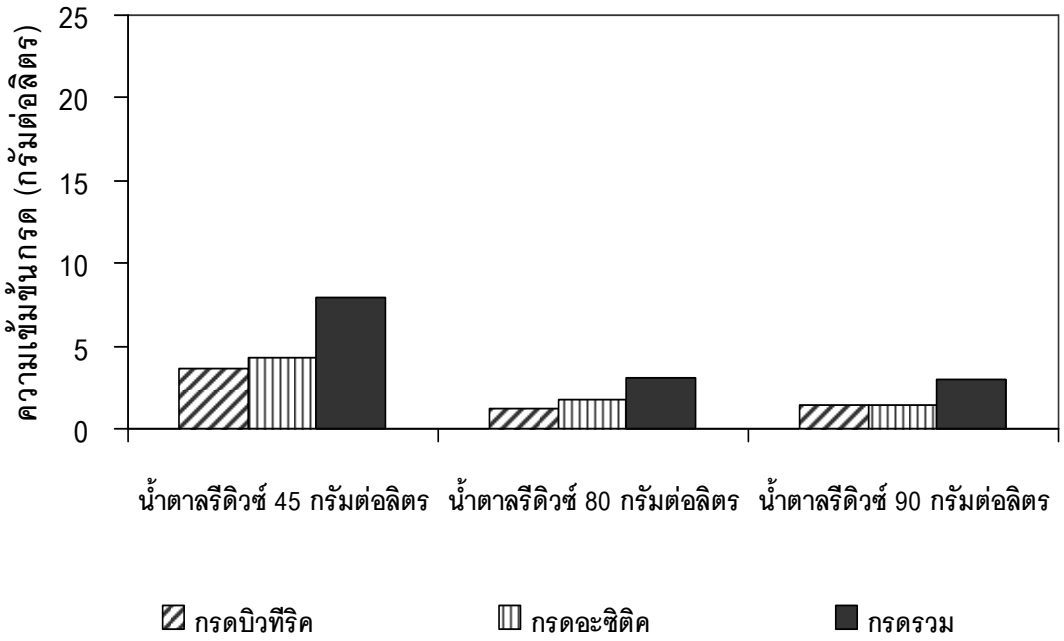
รูปที่ 4.36 ความเข้มข้นกรดและผลที่ได้จากการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

○เซลล์ Δ กรดอะซิติค

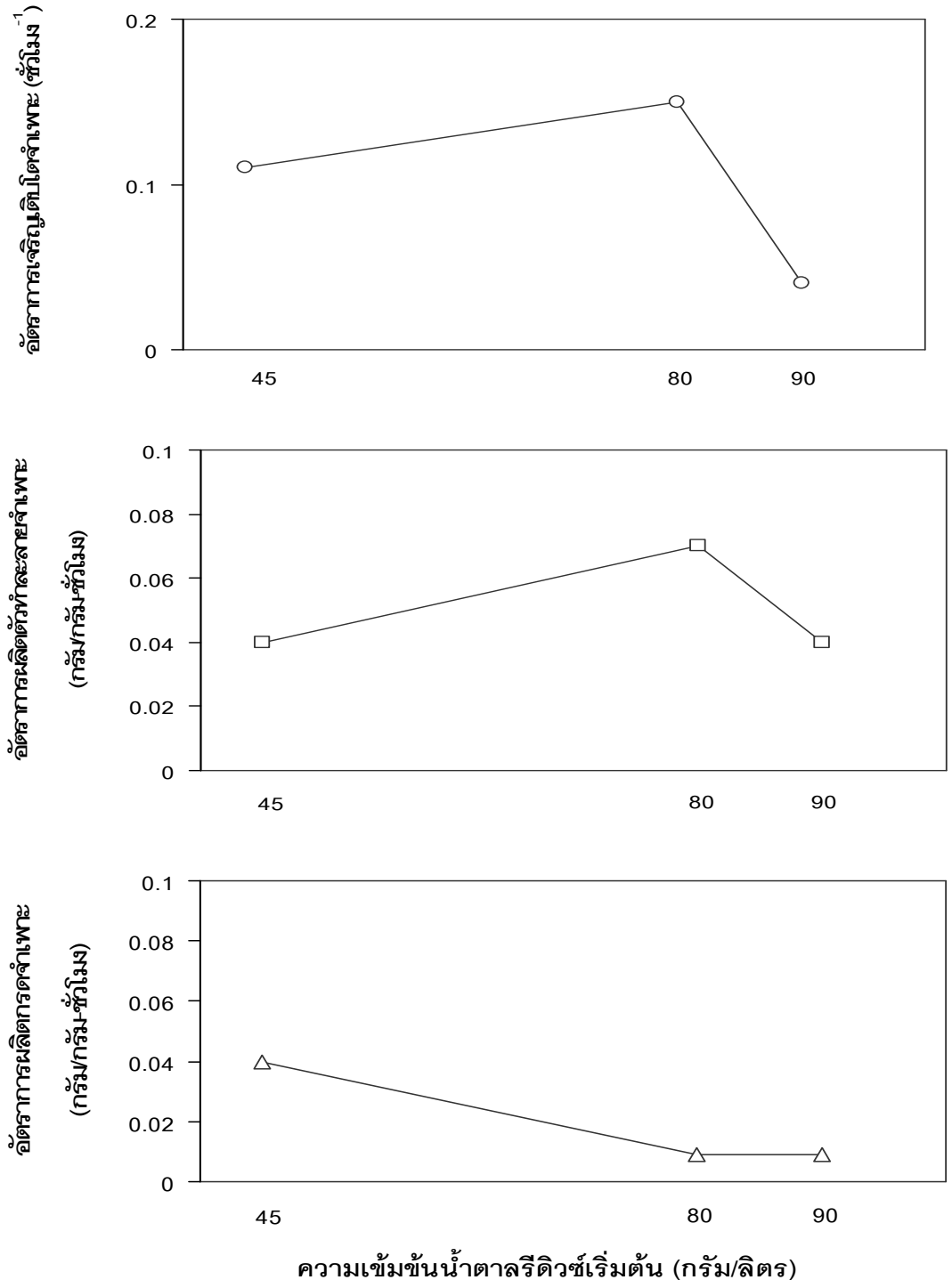
□ กรดบิวทิริค ◇ กรดรวม



รูปที่ 4.37 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าและความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.38 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการผลิตกรดจากน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0



รูปที่ 4.39 การเปรียบเทียบค่าจลน์ศาสตร์ของการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นของน้ำอ้อยต่างๆ

○ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ □ อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ

Δ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นต่อการหมักและค่าจนล์ศาสตร์ของการหมักน้ำอ้อย ในอาหารสูตรที่ 2 โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

ตัวแปรการหมัก	ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)		
	45	80	90
อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	1.24	4.58	6.04
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	3.16	15.35	12.75
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	3.58	4.8	3.96
ตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	7.98	24.73	22.75
กรดบิวทิริค (กรัมต่อลิตร)	3.62	1.26	1.48
กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	4.33	1.79	1.48
กรดรวม (กรัมต่อลิตร)	7.95	3.05	4.97
น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	43.72	76.41	96.31
น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	42.65	75.7	84.68
เซลล์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)	2.14	3.55	2.92
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	96	96	196
ผลได้บิวทานอล (เปอร์เซ็นต์)	7.41	20.28	15.06
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	18.71	32.67	26.87
ผลได้กรดรวม (เปอร์เซ็นต์)	18.64	4.03	5.87
อัตราการผลิตบิวทานอล (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.03	0.16	0.07
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.08	0.26	0.12
อัตราการผลิตกรดรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.08	0.03	0.03
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	0.11	0.15	0.04
อัตราการผลิตบิวทานอลจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.01	0.05	0.02
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.04	0.07	0.04
อัตราการผลิตกรดรวมจำเพาะ (กรัมต่อกรัม-ชั่วโมง)	0.04	0.009	0.009

4.6 การศึกษาการใช้มันสำปะหลังสดเปรียบเทียบกับการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตตัวทำละลาย

มันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากในมันสำปะหลังสด มีสารอาหารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี ดังนั้นในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *C.acetobutylicum* ATCC 824 ระหว่างกระบวนการหมักน้ำอ้อยและกระบวนการหมักมันสำปะหลังสด ที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุด

ผลการทดลองกระบวนการหมักมันสำปะหลังสด ความเข้มข้นมันสำปะหลังสดเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.5 และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นสภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุด พบว่า เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ผลิตตัวทำละลายรวมได้ 9.38 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 พบว่า กระบวนการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสดใช้ระยะเวลาในการหมักที่น้อยกว่า คือ 72 ชั่วโมง ขณะที่กระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยใช้ระยะเวลาในการหมักถึง 96 ชั่วโมง กระบวนการหมักโดยใช้น้ำอ้อยผลิตตัวทำละลายได้ดีกว่า ดังแสดงดังตารางที่ 4.6 โดยมีการผลิตบิวทานอลสูงกว่าประมาณ 3 เท่า ผลได้ตัวทำละลายรวมและอัตราการผลิตตัวทำละลายรวมสูงกว่าประมาณ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้มันสำปะหลังสด

ดังนั้นการใช้น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตบิวทานอลและตัวทำละลาย มีความน่าสนใจและมีความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงหรือขยายขนาดสู่อุตสาหกรรมได้

ตารางที่ 4.6 ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำอ้อยและมันสำปะหลังสดเป็นวัตถุดิบในการผลิตตัวทำละลาย โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ปริมาณผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ (แหล่งคาร์บอน)	
	น้ำอ้อย*	มันสำปะหลังสด**
ปริมาณตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร)	24.73	9.38
บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	15.35	4.98
ผลได้ตัวทำละลายรวม (เปอร์เซ็นต์)	32.67	16.31
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวม (กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง)	0.26	0.13
อัตราการผลิตตัวทำละลายรวมจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.07	-

*ทำการทดลองที่ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

** ทำการทดลองที่ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล (ABE fermentation) ในถังหมักแบบกะ 1 ลิตร ในอาหารสูตรที่ 1

เมื่อทำการศึกษาการผลิตตัวทำละลายของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 โดยการแปรผันชนิดของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ น้ำอ้อย กลูโคส และซูโครสบริสุทธิ์ ควบคุมสภาวะการหมักที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตตัวทำละลายได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนการใช้น้ำตาลกลูโคสมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงเป็นอันดับแรก

ส่วนการใช้ซูโครสและน้ำอ้อยที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ต้องมีการย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนการนำไปใช้ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเทียบกับการหมักด้วยกลูโคส จากงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้น้ำตาลของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีรายงานว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว โดยมีการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตสและเข้าสู่วิถีของการสร้างกรดและตัวทำละลายชนิดต่างๆ ต่อไป แต่ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว จะไม่มีการสร้างเอนไซม์ในการใช้ซูโครส และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีทั้งน้ำตาลกลูโคสและซูโครส โดยเลี้ยงเชื้อเบื้องต้นในอาหารซูโครสก่อน จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสให้หมดก่อน จึงมีการใช้ซูโครสต่อไป [35]

นอกจากนี้ในน้ำอ้อยจะมีสารอาหารอื่นๆ เช่น วิตามิน เกลือแร่ และกรดอะมิโน ที่ช่วยส่งเสริมการสร้างผลิตภัณฑ์ ทำให้มีอัตราการผลิตกรดจำเพาะและอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมากกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครส

การศึกษาประสิทธิภาพในการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ของเชื้อคลอสตริเดียม 3 สายพันธ์ ได้แก่ *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* TISTR 1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่า เชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ผลิตตัวทำละลายได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *C. butylicum* TISTR 1032 ส่วนเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ให้ความเข้มข้นตัวทำละลายน้อยที่สุด

โดยเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 มีอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมากกว่าการใช้เชื้อ *C. butylicum* TISTR 1032 และคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทยประมาณ 4 เท่า และ 8 เท่า ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดจำเพาะมากกว่าเป็น 6.5 เท่า และ 12 เท่า ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการหมักสารอาหารน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ของเชื้อ *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำเท่ากับ 4.5 เชื้อคลอสตริเดียมเจริญเติบโตได้ดี มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด แต่ผลิตกรดได้ไม่ดี (อัตราการผลิตกรดจำเพาะต่ำ) โดยการผลิตตัวทำละลายจะเกิดขึ้นในช่วงสั้นๆ และผลิตได้ไม่สูงนัก ส่งผลให้มีอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะต่ำที่สุด ภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นที่ 5.5 เชื้อจุลินทรีย์มีการผลิตกรดและเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายได้ดีขึ้น ส่งผลให้อัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมาก (อัตราการผลิตกรดจำเพาะสูงขึ้น)

ภาวะที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการผลิตกรดจำเพาะสูงกว่าที่ภาวะควบคุมความเป็นกรดด่าง 5.0 แต่มีอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่รายงานว่า ขั้นตอนการเปลี่ยนจากการสร้างกรดเป็นการสร้างตัวทำละลาย ถ้ามีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างอย่างเหมาะสม จะส่งผลให้มีการสร้างตัวทำละลายได้ดีกว่าปล่อยให้มีการดำเนินไปอย่างอิสระ โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง [36]

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า เชื้อ *C. actobutylicum* ATCC 824 มีการสร้างผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ (กรดอะซิติคและบิวทิริค) ในความเข้มข้นที่สูง และไม่สามารถเปลี่ยนกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นไปเป็นตัวทำละลายได้ แม้ว่าการใช้อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรสารอาหารที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลสำหรับเชื้อคลอสตริเดียม มักให้ความเข้มข้นตัวทำละลายรวมได้ประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ให้อัตราส่วนบิวทานอลต่ออะซิโตนต่อเอทานอลเท่ากับ 6:3:1 แต่จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ มีข้อแตกต่าง จึงทำการปลี่ยนสูตรสารอาหารที่ใช้ในการหมัก ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และทำการหมักที่สภาวะการหมักเดียวกัน พบว่า เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตตัวทำละลายได้ดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการผลิตกรดจำเพาะ และอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะมากกว่าการใช้อาหารสูตรที่ 1 (รูปที่ 4.30) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Welsh และคณะ ปี 1987 และ Madihah และคณะ ปี 2001 ที่ได้รายงานถึง ความสำคัญของการใช้แหล่งไนโตรเจนผสมในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ว่ามีส่วนส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนกรดเป็นตัวทำละลาย แอมโมเนียมอะซิเตตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แตกตัวให้แอมโมเนียมอิออน (NH_4^+)

ซึ่งให้ผลเชิงบวกต่อการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลาย และอะซิเตตที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอะซิโตน [37, 38] ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อน ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน วิตามิน เกลือแร่ และโกรทแฟคเตอร์จำนวนมาก มีส่วนส่งเสริมการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในการสร้างกรดและตัวทำละลาย

ในอาหารสูตรที่ 2 ยีสต์สกัดที่ได้จากเซลล์ยีสต์และทริปโทนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนเคซิน ที่มีองค์ประกอบของเปปไทด์ และกรดอะมิโน โดยมีกรดอะมิโนทริปโทเฟนเป็นส่วนใหญ่ (tryptophan) ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลต์จะให้แอมโมเนียและกรดไพรูเวท ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตตัวทำละลาย (รูปที่ 2.1) ทำให้การใช้แหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนทั้งสองชนิดเป็นสารอาหารในการหมัก มีผลเปลี่ยนแปลงให้เกิดการเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นจาก 45 ถึง 80 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรที่ 2 จะมีการเพิ่มการผลิตตัวทำละลายและบิวทานอลตามลำดับ รวมทั้งให้ความเข้มข้นเซลล์อยู่ในแนวโน้มที่สูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เกิดการสร้างตัวทำละลายได้สูงที่สุด ในสภาวะที่กำหนด คือที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น 90 กรัมต่อลิตร ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการผลิตตัวทำละลายของเซลล์ได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักบิวทานอลอยู่ที่ 45-60 กรัมต่อลิตร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร จะส่งผลยับยั้งกระบวนการหมัก [7] ดังนั้นการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน มีข้อดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากการใช้น้ำอ้อยสามารถใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงขึ้นกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส

จากตารางที่ 5.2 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต อะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล โดย *C.acetobutylicum* ATCC 824 เมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรที่ 2 มีประสิทธิภาพในการผลิตตัวทำละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ดี โดยมีความเข้มข้นของบิวทานอลสูง นอกจากนี้การใช้น้ำอ้อยในการหมักไม่มีขั้นตอนยุ่งยาก และไม่ต้องผ่านการแปรรูปก่อนการนำมาใช้ กระบวนการหมักจากน้ำอ้อยจึงเป็นกระบวนการที่น่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตอะซิโตน บิวทานอลและเอทานอล ของเชื้อ *C.acetobutylicum* ATCC 824 เมื่อใช้วัตถุดิบต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอน	ตัวทำละลาย (กรัมต่อลิตร)	บิวทานอล (กรัมต่อลิตร)	อะซิโตน (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดบิวทีริค (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร)	รายการอ้างอิง
น้ำตาลจากการย่อยสลายเปลือกเมเปิล	13.82	10.89	2.38	0.55	2.22	3.90	[39]
น้ำอ้อยสด	24.73	15.35	4.58	4.80	1.26	1.79	งานวิจัยนี้ (อาหารสูตรที่2)
มันสำปะหลังสด	20.16	11.28	8.63	0.25	-	0.38	[5]
หางนม	7.39	0.71	0.26	6.42	10.47	13.10	[40]
น้ำตาลจากการย่อยสลายแป้งมัน	16.65	8.94	7.45	0.26	-	1.20	[5]

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองการหมักน้ำอ้อยที่ไม่มีการเจือจาง ซึ่งมีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 120-140 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จาก 80 กรัมต่อลิตร เป็น 90 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นของบิวทานอลไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงคาดว่าการใช้น้ำอ้อยไม่เจือจางก็อาจให้ความเข้มข้นบิวทานอลสูงเช่นเดียวกัน ซึ่งการใช้น้ำอ้อยไม่เจือจางจะช่วยลดระยะเวลาการเตรียมน้ำอ้อยลงได้

2. ควรทดลองกระบวนการผลิตตัวทำละลายจากน้ำอ้อย โดยเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธ์อื่นๆ เพิ่มเติม ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการหมักของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธ์ต่างๆ จะไม่เหมือนกัน แต่จะมีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นสามารถประยุกต์ใช้สภาวะการหมักที่ได้จากงานวิจัยนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการทดลองกระบวนการหมักของเชื้อคลอสตริเดียมสายพันธ์อื่นๆ ต่อไป ซึ่งอาจจะลดระยะเวลาในส่วนของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักได้

3. ควรศึกษาการหมักน้ำอ้อย โดยการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากในงานวิจัยนี้ ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดร่วมกับการใช้ทริปโทนและแอมโมเนียมอะซิเตต ซึ่งมีราคาแพง เมื่อใช้ในอุตสาหกรรมจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ไม่คุ้มค่าในการผลิต ดังนั้นอาจหาแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น ยีสต์สกัดที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ หางนม หรือกากถั่วเหลือง เป็นต้น ทดแทนการใช้ยีสต์สกัดและทริปโทน

4. ในอุตสาหกรรมชีวภาพมักจะใช้ถังหมักแบบกะ เนื่องจากง่ายในการดำเนินการ มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนน้อย แต่จะให้ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายต่ำ เนื่องจากจะมีช่วงปรับสภาพ (lag phase) ที่นาน และมีการยับยั้งผลิตภัณฑ์ ซึ่งเวลาในการเตรียมและการมีช่วงปรับสภาพนานนั้น สามารถลดโดยการใช้การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture) ส่วนปัญหาจากการยับยั้งผลิตภัณฑ์ สามารถแก้ไขโดยการใช้ระบบดึงผลิตภัณฑ์ออก (product remove system) หรืออาจใช้การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) เพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งผลิตภัณฑ์ และเพิ่มปริมาณเซลล์ นอกจากนี้ อาจใช้ถังหมักแบบตรึงเซลล์ (immobilized cell reactor) และถังหมักแบบดึงกลับเซลล์ (recycle reactor) เพื่อให้ค่าอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปอาจพัฒนากระบวนการหมักโดยการใช้กระบวนการหมักแบบกะร่วมกับการทำเพอร์เวปโพเรชั่น หรือกระบวนการหมักแบบกึ่งกะร่วมกับการทำเพอร์เวปโพเรชั่น ซึ่งคาดว่าจะได้ความเข้มข้นและอัตราการผลิตตัวทำละลายเพิ่มมากขึ้น

รายการอ้างอิง

[1] Energy Clinic. ปริมาณสำรองน้ำมันดิบ. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.oknation.net/blog/energyclinic. [2553, กันยายน 28]

[2] ศูนย์พยากรณ์และสารสนเทศพลังงานสำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน สถานการณ์พลังงานปี 2552 และแนวโน้มปี 2553. [ออนไลน์]. 2552. แหล่งที่มา: http://www.eppo.go.th/info/2010/energyforecast2009_12.html. [2553, กันยายน 28]

[3] Sang, Y.L., Jin H.P., Seh,H.J., Lers,K.N., Jaehyum,K. and Kwang,S.J. 2008. Fermentative Butanol Production by Clostridia. Biotecnology and Bioengineering. 101, 2: 209-228.

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

[5] จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์ เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ และพูลพร แสงบางปลา. 2544. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต n-Butanol จากวัสดุทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์สันดาปภายใน. ทุนอุดหนุนการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรมจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2544.

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

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

[8] Qureshi, N., Saha, B.C., Hector, R.E., Cotta, M.A. 2008. Removal of fermentation inhibitor from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Closteidium beijerinckii* in batch reactor. Biomass and Bioenergy. 32:1353-1358.

[9] Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S. 2004. 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. 98, 4: 263- 268.

[10] Qureshi, N. and Maddox, I.S. 2005. REDUCTION IN BUTANOL INHIBITION BY PERSTRACTION: Utilization of Concentrated Lactose/Whey Permeate by *Clostridium acetobutylicum* to Enhance Butanol FermentationEconomics. Trans IChemE. 83, 1: 43-52.

[11] Mitchell, W.J. 1998. Physiology of carbohydrates to solvent conversion by clostridia. Adv Microb Physio. 39: 31-130.

[12] Patakova, P., Lipovsky, J., Cizkova, H., Fortova, J., Rychtera, M., and Melzoch, K. 2009. Exploitation of Food Feedstock and Waste for Production of Biobutanol. Czach J. Food Sci. 27, 4: 276-283.

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

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

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

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

[17] Andrade, J.C., and Vasconcelos, L. 2003. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilization. Biotechnol Lett. 25: 121-125.

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

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

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

[21] Qureshi, N., Ezeji, T.C., Ebener, J., Dien, B.S., Cotta, M., Blaschek, H.P. 2008. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. Bioresource Tech. 99: 5915-5922.

[22] Ezeji, T.C., Qureshi, N., Blaschek, H.P. 2004. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogration :butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA 101. J. of Biotechnology. 115: 179-187.

[23] Sallam, L.A.R., El-Refai, A.H., Allam, R.F., Shafei, M.S., El-Ard, O.A.M. 2004. Mathematic modeling and simulation of batch acetone-butanol fermentation with immobilized cell of *Clostridium acetobutylicum*. Anab J. biotech. 7, 1:1-12.

[24] Gutierrez, N.A., Schuster, K.C., Maddox, I.S., Swoboda,H. and Gapes, J.R. 1998. Strain comparison and medium preparation for the acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process using a substrate of potato. Bio resource Technology. 66, 3:263-265.

[25] Quresshi, N., Saha, B.C. and Cotta M.A. 2007. Butanol productionfrom wheat straw hydrolisate using *clostridium beijerinckii*. Bioprocess Biosyst Eng. 30: 419-427

[26] Badr, H.R., Toledo, R. and hamdy, M.K. 2001. Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of clostridium acetobutylicum. Biomass and Bioenergy. 20, 2:119-132.

[27] Mcneil, B. and Kistiahsen, B. 1985. Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch culture of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnology Letters.7, 7: 499-502.

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

[29] Tarkow, H. and Feist, C.S. 1969. Adv. Chem. Ser. 95 :197

[30] Linda, K.B. and Ellefson. 1985. Appl.Environ Microbiol. 50, 5:1165-1170.

[31] Grott schall, G. and Bahl H. 1981. 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: 463-471.

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

[33] Ezeji, T., Qureshi, N. and Blaschek, H.P. 2006. Production of acetone-butanol ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*.Process Biochem. 42: 34-39.

[34] Lee, J., Mitchell, W.J., Tangney, M. and Blaschek, H.P. 2005. 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: 3384-3387

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

[36] Monot, F., Engasser. J.M. and Petidemange, H. 1984. Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch culture of *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 19: 422-426.

[37] Welsh, F.W., Williams, R.E. and Veliky, I.A. 1987. Organic and inorganic nitrogen source effect on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 26: 369-372.

[38] Madihah, M.S., Arift, A.B., Sahaid, K.H., Suraini, K.M. and Karin, M.I.A. 2001. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. Microbiology & Biotechnology. 17: 567-576.

[39] Sun Z. and Liu S. 2010. Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC 824. Biomass and Bioenergy. 30:1-9.

[40] Foda, M.I., Dong, H. and Li, Y. (2010). Study the Suitability of Cheese Whey for Bio Butanol Production by Clostridia. J. American Science. 8, 8:39-46

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรสารอาหารในการหมัก

ตารางที่ ก. สารอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตตัวทำละลาย

สารอาหาร	ความเข้มข้นสาร (กรัมต่อลิตร)	
	อาหารสูตรที่ 1 [3,4]	อาหารสูตรที่ 2 [7]
K_2HPO_4	0.5	-
KH_2PO_4	0.5	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.3
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	0.01
MnSO4.7H2O	0.01	-
NaCl	0.01	-
Yeast extract	6	2
Tryptone	-	6
CH_3COONH_4	-	3

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลอง

ข.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของน้ำอ้อย วิเคราะห์โดยใช้วิธี DNS analysis โดยเริ่มจากย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่ทั้งหมดในตัวอย่าง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยสารละลายกรด ที่อุณหภูมิสูง และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายเบส จากนั้นทำการตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยง และนำส่วนใส (supernatant) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายไดโนโตรซาลิกไซลิก (DNS) ที่อุณหภูมิสูง เกิดสารละลายสีน้ำตาล ซึ่งต้องมีการทำให้เจือจางอย่างเหมาะสม นำไปวิเคราะห์ด้วยเสปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานซูโครส

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริค

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 20 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ในภาชนะแก้วที่แช่ในอ่างน้ำ เพื่อลดความร้อนที่เกิดขึ้น

เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริค 37 เปอร์เซ็นต์ โดยการเจือจางความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่น ในตู้ระบายอากาศ

2. การเตรียมสารละลายไดโนโตรซาลิกไซลิก (DNS)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.633 กรัม (98 เปอร์เซ็นต์โดยมวล) ในน้ำ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) อย่างช้าๆ เติมสาร 3-5-dinitrosaliccylic acid 1 กรัม ในสารละลาย ให้มีการละลายเป็นเนื้อเดียว แล้วทำการเจือจางโดยเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสาร Na-K tartrate 30 กรัม ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และเก็บสารละลายในขวดสีชาเป็นเวลา 3 วันก่อนนำมาใช้ และไม่ควรใช้สารละลายที่เก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส

สารละลายซูโครสมาตรฐาน เตรียมโดยการอบซูโครส 3 กรัม ที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และทำการละลายซูโครส 2.5 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร และนำมาเจือจางตามวิธีในตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข1.1 การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0-250 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร)	สารละลายซูโครส (มิลลิลิตร)	น้ำ (มิลลิลิตร)
0	0	2.0
6.25	0.5	1.5
12.50	1.0	1.0
18.75	1.5	0.5
25.00	2.0	0

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริค 37 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น หลังจากนั้น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใส 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ข.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

1. เตรียมตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการแยกเซลล์ออกจากสารอาหารโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกำจัดส่วนที่ลอยด้านบนออก
2. เติมน้ำกลั่น ลงในเซลล์ข้อ 2. ที่ผ่านการกำจัดส่วนที่ลอยออก
3. จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออกอีกครั้ง
4. จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง โดยการทำซ้ำตามข้อที่ 3.
5. เทเซลล์แขวนลอยลงในถ้วยอะลูมิเนียมฟลอยล์ที่ผ่านการอบและชั่งน้ำหนักแล้ว
6. จากนั้นทำให้เซลล์แห้ง โดยการอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ที่แห้ง

ข.3 การหาความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอย

เซลล์แขวนลอยที่ทราบความเข้มข้นถูกนำมาใช้เพื่อเป็นค่ามาตรฐาน โดยตัวอย่างที่ได้จากการหมักนำมาวิเคราะห์เทียบกับค่ามาตรฐาน

1. ทำการแยกเซลล์แขวนลอย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วกำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออก
2. เติมน้ำกลั่น ลงในเซลล์ ข้อ 2. ที่ผ่านการกำจัดส่วนที่ลอยออก
3. จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และกำจัดส่วนที่ลอยอยู่ด้านบนออกอีกครั้ง
4. จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง โดยการทำซ้ำตามข้อ 3. แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

การคำนวณ

การวิเคราะห์ข้อมูล

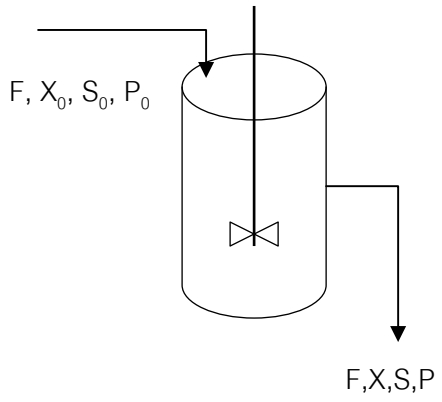
1. ค่าผลได้ตัวทำละลายรวมและค่าผลได้กรดรวม (Yield)

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

2. ค่าอัตราการผลิตตัวทำละลายและอัตราการผลิตกรดรวม (productivity)

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

3.ค่าจลน์ศาสตร์ของการหมัก



เมื่อ F: เป็นอัตราการไหลเข้า-ออก ของสารละลายอาหาร (กรัมต่อลิตร)

X_0, X : เป็นค่าความเข้มข้นของชีวมวลในสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

S_0, S : เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายอาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

P_0, P : เป็นค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในสารละลายอาหารที่เข้า-ออกถังหมัก (กรัมมต่อลิตร)

V : เป็นปริมาณของสารละลายในถังหมัก (ลิตร)

สมการสมดุลย์เชิงชีวมวล

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

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)

สมการสมดุลย์เชิงผลิตภัณฑ์

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

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 ง
ข้อมูลทางการทดลองและกราฟมาตรฐาน

ง.1 ข้อมูลทางการทดลอง

ตารางที่ ง1.1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

เวลา (ชม.)	กลูโคส	ฟรุคโตส	ซูโครส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	3.99	3.56	50.44	57.98	0.02	0.01	0.21	0.28	0.17	0.24	0.45	0.11
6	1.21	1.73	40.52	43.46	0.03	0.01	0.41	0.80	0.96	0.45	1.75	0.65
12	1.70	1.98	25.66	29.34	0.21	0.02	0.43	4.27	3.24	0.66	7.51	0.71
18	6.62	8.35	11.81	28.10	0.29	0.02	0.42	5.91	4.42	0.73	10.32	0.85
24	8.46	11.90	7.13	27.10	0.63	0.07	0.52	9.20	6.73	1.22	15.93	0.87
30	11.39	11.30	4.62	26.20	0.82	0.13	0.67	10.78	8.02	1.62	18.80	0.89
36	9.79	11.00	1.69	22.48	1.42	0.25	4.23	14.78	11.53	5.90	26.31	0.94
42	6.86	11.99	0.68	19.54	1.46	0.23	4.76	13.43	9.47	6.45	22.90	0.86
48	6.06	11.33	0.60	17.98	1.59	0.23	4.67	13.39	9.81	6.49	23.20	0.54
54	6.20	10.90	0.40	17.50	1.61	0.24	4.83	13.38	9.90	6.68	23.28	0.52
62	5.32	11.53	0.21	17.06	1.74	0.21	4.93	13.46	9.98	6.88	23.44	0.50
66	5.20	11.40	0.10	16.70	1.82	0.28	5.41	13.54	9.95	7.51	23.49	0.51
72	5.10	10.20	0.10	15.40	1.98	0.32	5.41	13.66	10.07	7.71	23.74	0.44
85	5.10	9.80	0.10	15.00	1.65	0.28	5.35	10.86	9.87	7.28	20.73	0.43
96	4.90	9.80	0.09	14.80	1.34	0.21	5.31	10.88	9.56	6.86	20.44	0.42

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกลูโคสที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

เวลา (ชม.)	กลูโคส	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	56.00	0.03	0.01	0.04	0.47	0.48	0.08	0.95	0.19
6	46.45	0.50	0.03	0.21	3.52	4.69	0.75	8.21	1.09
12	37.60	0.65	0.11	0.29	4.99	4.88	1.09	9.87	2.69
18	34.85	0.82	0.28	0.33	5.32	4.98	1.44	10.30	2.59
24	29.25	0.86	0.31	0.43	5.89	4.85	1.22	10.74	2.30
30	26.96	0.95	0.39	0.58	6.37	4.89	1.77	11.26	1.71
36	24.01	1.41	0.41	0.63	6.48	4.72	2.45	11.20	1.42
42	21.58	1.39	0.40	0.59	6.83	4.65	2.38	11.48	1.27
48	19.90	1.38	0.40	0.56	6.72	4.47	2.21	11.19	1.14
54	17.65	1.37	0.39	0.55	6.79	4.44	2.23	11.23	1.17
60	17.55	1.39	0.40	0.55	6.57	4.57	2.19	11.14	1.19
66	17.05	1.37	0.40	0.59	8.85	5.68	2.06	14.53	1.19
72	16.75	1.38	0.43	0.60	8.74	5.33	2.08	14.07	1.14
78	16.35	1.39	0.43	0.62	8.84	5.64	2.09	14.48	1.19
90	15.70	1.38	0.42	0.61	8.82	5.62	2.09	14.44	1.18
96	14.35	1.41	0.43	0.60	8.84	5.65	1.86	14.49	1.19

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.3 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

เวลา (ชม.)	ซูโครส	กลูโคส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	51.20	0.38	62.92	0.03	0.01	0.02	0.56	0.83	0.07	1.39	0.08
6	36.20	5.05	62.78	0.10	0.05	0.22	0.85	0.96	0.36	1.81	0.45
12	33.10	6.01	58.34	0.16	0.04	0.28	1.57	1.52	0.49	2.36	1.47
18	15.90	6.62	40.70	0.36	0.05	0.29	3.26	4.24	0.66	7.50	1.52
24	13.50	6.89	37.36	0.37	0.07	0.34	5.95	5.48	0.73	11.43	2.38
30	12.20	7.48	36.95	0.48	0.17	0.57	6.68	5.71	1.22	12.39	2.42
36	11.60	7.52	34.45	0.84	0.31	0.58	7.52	7.24	1.73	14.75	2.48
42	9.56	6.54	34.31	0.95	0.29	0.59	6.78	6.46	1.55	13.24	2.17
48	9.15	6.47	33.47	1.01	0.35	0.58	6.56	6.50	1.75	12.38	1.59
54	8.55	6.41	31.25	1.06	0.33	0.59	6.38	6.54	1.54	12.92	1.43
60	8.80	6.30	30.42	1.11	0.37	0.63	6.37	6.70	1.87	13.07	1.42
66	8.30	6.50	29.45	1.11	0.41	0.78	7.51	6.81	2.28	14.32	1.38
72	8.30	6.52	29.45	1.12	0.42	0.76	7.50	7.05	2.31	13.74	1.19
78	7.35	6.15	29.17	1.12	0.41	0.77	7.50	7.15	2.30	14.65	1.14
90	7.35	6.15	29.03	1.12	0.42	0.75	7.51	7.19	2.29	14.70	1.08
96	7.40	6.10	28.34	1.12	0.41	0.76	7.50	7.18	2.29	14.68	1.06

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. butylicum* TISTR 1032 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

เวลา (ชม.)	ซูโครส	กลูโคส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทีริค	อะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	47.50	0.48	65.01	0.11	0.01	0.19	0.55	2.03	0.31	2.58	0.49
6	39.00	0.47	64.03	0.12	0.02	2.24	0.94	3.30	2.38	4.24	0.65
12	33.56	0.49	45.87	0.38	0.03	2.42	1.22	4.18	2.83	5.40	1.00
18	25.10	0.52	36.81	0.57	0.09	3.16	7.26	7.01	3.82	14.26	1.14
24	17.80	0.57	30.28	0.68	0.10	3.25	8.16	7.32	4.03	15.48	2.16
30	8.65	1.05	25.70	0.77	0.14	3.26	9.43	7.49	5.07	16.93	2.20
36	5.70	1.23	23.47	1.09	0.19	3.26	11.62	9.08	4.54	20.71	2.13
42	4.17	1.18	20.84	1.23	0.20	3.15	13.20	9.57	4.36	22.77	1.98
50	3.59	1.17	19.17	1.49	0.35	3.13	12.47	9.79	4.97	22.26	1.96
54	3.32	1.15	19.03	1.55	0.38	3.23	12.44	9.81	4.40	22.25	1.93
60	3.19	1.09	18.61	1.62	0.41	3.22	12.36	9.84	3.75	22.20	1.82
72	3.02	1.07	18.33	1.93	0.46	3.19	12.81	10.48	3.77	23.28	1.81
78	3.26	0.97	17.78	2.10	0.48	3.21	12.58	10.52	3.35	23.10	1.80
84	3.04	1.05	17.64	2.32	0.51	3.23	12.96	10.62	4.52	23.58	1.77
90	2.99	1.05	17.36	2.34	0.52	3.25	13.72	10.98	4.65	24.70	1.77
96	2.25	0.96	16.95	2.29	0.52	3.22	13.64	10.89	4.68	24.53	1.74

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อคลอสตริเดียมที่คัดแยกได้ในประเทศไทย ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5

เวลา (ชม.)	ซูโครส	กลูโคส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	อะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	49.70	6.03	68.06	0.01	0.01	0.34	1.08	0.98	0.36	2.06	0.38
6	32.90	5.66	55.98	0.02	0.05	1.48	2.24	2.86	1.71	5.10	1.14
12	29.40	1.45	53.34	0.02	0.03	1.90	5.46	3.24	1.96	8.70	1.23
18	28.50	0.60	45.88	0.02	0.03	1.85	6.78	2.67	1.92	9.45	1.25
24	22.80	0.26	39.73	0.03	0.01	1.89	7.39	2.67	1.73	10.05	1.25
30	22.30	0.19	30.97	0.04	0.01	1.86	7.80	2.46	1.53	10.26	1.27
36	22.20	0.21	30.84	0.05	0.01	1.89	8.46	2.72	1.91	11.18	1.55
42	21.15	0.14	30.42	0.06	0.02	1.93	9.83	2.68	1.96	12.50	1.56
50	17.80	0.20	29.72	0.07	0.02	1.99	9.60	3.05	1.82	12.65	1.60
56	16.25	0.23	29.17	0.08	0.01	2.22	8.98	2.96	1.95	11.94	1.82
60	16.30	0.39	29.03	0.07	0.02	2.57	8.98	2.40	2.63	11.38	1.79
72	15.50	0.55	28.75	0.08	0.01	2.63	9.46	2.80	2.67	12.26	1.81
78	15.35	0.58	28.47	0.09	0.01	2.60	9.45	2.52	2.63	11.97	2.18
84	14.90	0.60	28.75	0.09	0.02	2.49	9.81	3.25	2.60	13.06	2.42
90	14.55	0.93	28.89	0.12	0.02	2.54	9.48	2.95	2.68	12.43	2.53
96	13.60	1.00	28.89	0.14	0.02	2.58	10.75	3.08	2.74	13.82	2.25

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5

เวลา (ชม.)	กลูโคส	ฟรุคโตส	ซูโครส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	อะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	3.69	2.29	50.98	56.95	0.08	0.02	0.79	0.24	0.53	0.89	0.77	0.21
6	1.03	1.39	49.58	52.00	0.08	0.03	0.80	0.69	0.81	0.91	1.50	1.51
12	1.19	1.17	47.91	50.27	0.08	0.23	0.81	2.58	1.23	1.12	3.81	2.13
18	1.45	2.21	42.15	45.81	0.39	0.23	0.82	3.56	1.55	1.44	5.11	4.50
24	3.59	5.67	29.07	38.32	0.54	0.22	0.91	5.06	3.09	1.67	8.15	3.16
30	6.47	8.79	21.68	37.62	0.61	0.20	1.43	5.21	4.18	2.23	9.39	3.10
36	5.45	6.85	18.20	35.02	0.75	0.33	1.93	5.38	4.66	3.03	10.04	2.65
42	10.69	13.02	11.31	34.80	0.78	0.26	1.97	5.65	5.20	2.96	10.20	2.21
45	9.43	11.11	11.18	34.80	0.80	0.29	1.98	5.77	5.41	3.02	11.18	2.16
48	12.04	14.28	10.49	34.38	0.88	0.29	2.01	5.96	5.86	3.18	11.82	2.01
54	8.67	10.31	8.30	34.30	0.97	0.32	1.99	5.97	6.30	3.28	12.27	1.54
62	12.72	14.99	6.66	34.10	0.97	0.34	1.92	5.22	7.24	3.23	12.46	1.23
66	13.86	16.41	5.86	34	0.93	0.30	1.90	5.02	6.98	2.78	12.00	0.72
72	16.70	16.50	5.70	33.80	0.94	0.28	1.85	4.92	6.68	2.63	11.60	0.65
85	15.40	15.30	4.10	33.5	0.96	0.29	1.86	3.28	4.46	2.66	7.74	0.63
96	15.50	15.80	2.90	31.70	0.88	0.30	1.84	3.78	4.84	2.76	8.62	0.62

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

เวลา (ชม.)	ซูโครส	กลูโคส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	อะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	34.20	1.92	59.03	0.09	0.02	0.51	0.32	0.81	0.79	1.14	0.62
6	29.50	1.46	58.48	0.15	0.04	0.55	0.84	1.31	0.69	2.15	1.23
12	28.90	2.80	58.20	0.23	0.08	0.62	3.26	4.39	0.93	7.65	2.94
18	24.20	2.66	57.78	0.26	0.08	0.71	4.36	4.43	1.05	8.79	1.62
24	24.15	2.82	52.37	0.28	0.06	4.23	5.46	4.57	4.61	10.03	1.72
30	24.10	2.70	45.28	0.32	0.07	4.37	5.49	4.44	4.62	9.93	1.77
36	23.45	2.50	43.89	0.37	0.08	4.71	5.42	4.87	5.15	10.29	1.73
42	22.40	2.44	42.09	0.41	0.08	4.84	5.89	5.29	5.33	11.18	1.75
48	22.35	2.36	39.45	0.44	0.07	4.49	6.17	5.79	5.00	11.96	1.69
54	20.95	2.20	39.03	0.35	0.05	4.45	5.54	5.67	4.85	11.21	1.83
60	20.85	2.74	36.39	0.33	0.05	4.52	5.64	3.51	4.90	9.15	1.75
66	15.50	2.67	36.11	0.30	0.05	4.63	5.78	3.63	4.97	9.41	1.84
72	15.05	2.50	32.36	0.31	0.07	4.57	5.65	3.47	4.95	9.12	1.83
90	10.80	2.50	32.22	0.31	0.08	4.68	5.64	3.36	5.07	9.00	1.28
96	10.80	2.48	32.22	0.31	0.08	4.76	5.47	2.82	5.15	8.29	1.02

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.8 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

เวลา (ชม.)	ซูโครส	กลูโคส	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	อะซิติค	ตัวทำละลายรวม	กรดรวม	ความเข้มข้นเซลล์
0	55.98	3.28	65.28	0.01	0.02	0.21	0.87	1.08	0.25	1.95	0.20
6	54.50	1.92	59.73	0.04	0.02	0.29	0.97	1.16	0.35	2.13	0.49
12	53.90	1.89	57.50	0.14	0.02	0.67	3.98	2.47	0.82	6.46	1.74
18	51.20	1.90	57.64	0.16	0.02	0.71	4.25	2.51	0.89	6.76	2.42
24	33.80	1.12	55.28	0.32	0.03	1.21	4.39	3.58	1.10	7.97	2.18
30	30.50	3.36	54.03	0.48	0.07	2.24	4.96	4.99	2.79	9.95	2.06
36	26.00	5.00	52.78	0.51	0.08	2.52	4.68	5.17	2.84	9.85	1.67
42	25.90	7.00	51.67	0.57	0.07	2.77	4.55	5.42	2.86	9.97	1.58
48	24.80	8.00	51.39	0.56	0.06	2.94	4.35	5.48	3.41	9.83	1.31
54	22.80	9.05	51.67	0.62	0.05	2.99	4.50	5.51	3.51	10.01	1.35
62	21.05	9.60	49.31	0.68	0.05	2.98	4.49	5.49	3.38	9.98	1.30
66	18.50	10.40	49.03	0.75	0.06	3.00	4.25	5.39	3.40	9.64	1.40
72	18.80	11.65	49.03	0.83	0.06	3.04	4.25	5.38	3.54	9.63	1.36
85	16.15	12.05	48.48	0.95	0.06	3.04	5.50	6.87	3.63	12.37	1.16
96	12.45	10.15	38.20	1.12	0.09	3.04	7.60	11.02	4.25	18.62	1.00

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 45 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

เวลา (ชม.)	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ความเข้มข้นเซลล์
0	43.72	0.28	0.08	0.02	0.95	3.22	0.15
6	17.77	0.31	0.23	1.04	1.16	3.51	0.15
12	16.70	0.65	0.23	2.23	2.17	3.63	0.15
18	16.35	0.79	0.59	2.42	4.51	4.73	0.59
24	12.79	1.40	0.62	2.98	5.09	7.54	1.64
30	11.73	1.99	0.86	3.10	5.91	7.40	1.72
36	7.46	2.20	0.85	3.21	6.10	7.53	2.14
42	7.46	2.41	1.11	3.52	6.54	7.27	2.14
48	7.46	2.77	1.17	3.58	6.94	7.56	1.82
54	6.40	2.79	1.18	3.42	6.46	7.53	1.79
60	4.98	2.80	1.10	3.43	6.46	7.57	1.72
66	5.33	2.85	1.07	3.32	6.85	7.76	1.68
72	4.62	2.91	1.06	3.24	7.35	8.04	1.54
78	4.98	3.16	1.24	2.94	8.50	8.87	1.53
84	4.26	3.00	1.10	2.99	7.94	8.60	1.40
90	3.91	2.99	0.98	2.88	3.88	5.42	1.40
96	1.07	2.98	0.81	2.84	3.62	4.33	1.38

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.10 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

เวลา (ชม.)	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ความเข้มข้นเซลล์
0	55.09	0.18	0.02	0.01	2.02	2.72	0.42
6	36.25	0.25	0.11	2.44	1.67	3.45	0.45
12	34.83	0.34	0.08	2.61	2.07	4.11	0.47
18	28.79	0.76	0.07	2.52	6.06	10.32	2.14
24	14.57	1.34	0.27	2.37	9.00	9.01	2.19
30	14.22	1.85	0.80	2.25	7.35	5.85	2.27
48	13.51	2.38	0.97	2.23	5.79	3.11	2.46
66	4.62	2.74	1.09	2.12	7.88	4.12	2.64
90	4.26	3.81	0.98	2.11	7.63	3.87	1.44
96	3.91	3.81	0.98	2.02	7.62	3.83	1.43

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

เวลา (ชม.)	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ความเข้มข้นเซลล์
0	76.41	0.37	0.18	1.76	2.33	5.11	0.14
6	42.29	0.29	0.13	1.95	1.43	3.63	0.15
12	41.94	0.43	0.11	2.41	1.49	3.42	0.56
18	41.58	0.98	0.19	2.58	3.23	8.48	0.90
24	29.14	1.14	0.31	3.62	6.63	10.66	0.97
30	13.86	1.88	0.48	3.16	7.45	9.77	2.51
36	13.15	4.85	1.23	3.24	6.15	9.33	2.61
42	12.44	6.56	1.56	2.98	4.08	7.58	3.21
51	11.37	11.45	3.02	2.59	2.73	7.59	3.55
54	5.69	12.29	3.15	2.67	2.72	7.45	3.12
60	4.26	13.62	3.76	2.42	2.35	4.72	2.77
66	2.84	13.65	3.82	1.42	2.21	3.25	2.58
72	1.42	14.22	4.12	1.35	2.03	2.92	2.40
90	0.71	15.35	4.58	1.78	1.75	2.43	1.35
96	0.71	14.66	4.36	1.90	1.26	1.79	1.35

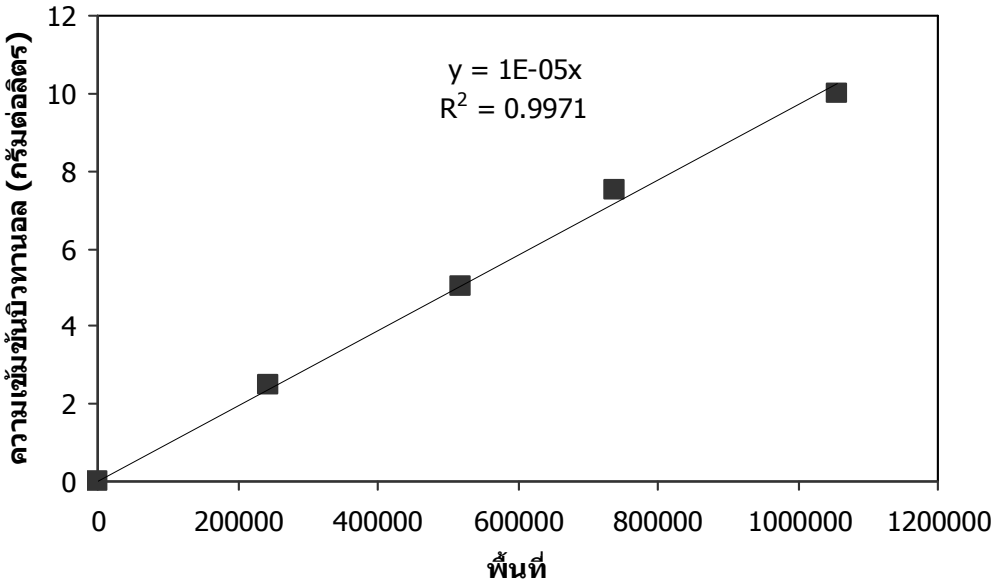
หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ง1.12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำอ้อยที่ความเข้มข้นน้ำตาล 90 กรัมต่อลิตร โดย *C. acetobutylicum* ATCC 824 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0

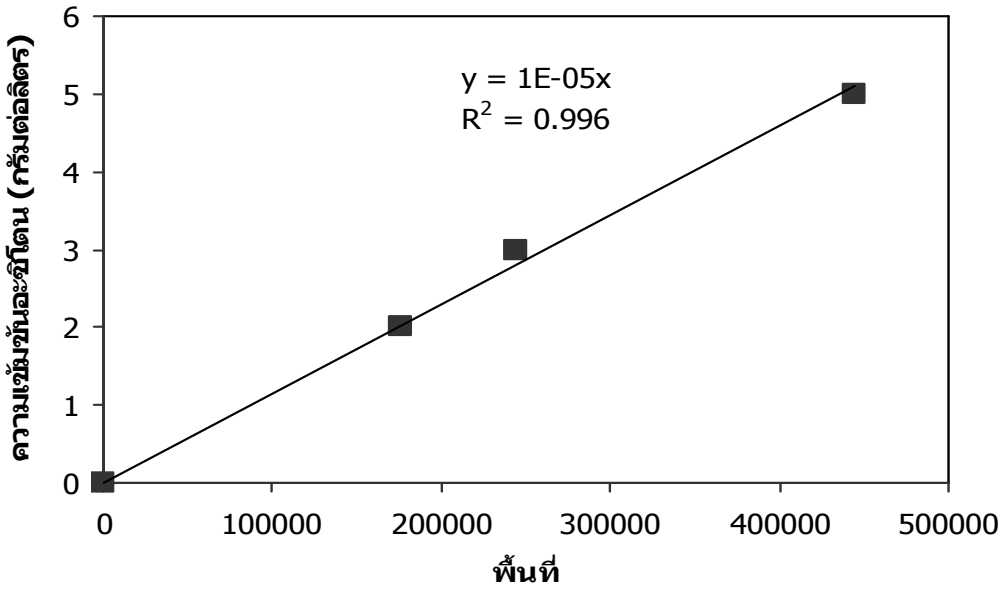
เวลา (ชม.)	น้ำตาลทั้งหมด	บิวทานอล	อะซิโตน	เอทานอล	กรดบิวทิริค	กรดอะซิติค	ความเข้มข้นเซลล์
0	96.31	0.09	0.05	1.07	2.25	0.29	0.13
6	81.03	0.09	0.06	1.13	2.34	0.24	0.17
12	73.63	0.09	0.06	1.16	2.39	0.23	0.17
18	69.69	0.10	0.07	1.18	2.40	0.27	0.17
24	67.82	0.17	0.07	2.80	2.38	0.23	0.22
30	64.37	0.25	0.07	3.35	2.33	0.33	0.22
36	63.56	0.35	0.16	3.18	2.30	0.29	0.22
48	58.34	0.89	0.16	3.13	2.21	0.28	0.23
72	57.21	4.78	1.78	3.19	3.45	0.98	1.34
96	56.12	8.98	3.08	3.21	4.76	1.65	1.99
120	42.10	10.15	4.69	3.26	5.08	2.09	2.92
138	23.26	11.60	5.42	3.31	4.94	1.88	2.51
146	16.36	11.55	6.04	3.50	4.96	1.76	2.30
156	12.91	11.65	5.73	3.53	4.96	1.71	1.91
196	11.63	12.75	5.84	3.96	4.97	1.48	1.09

หมายเหตุ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีหน่วยเป็น กรัมต่อลิตร

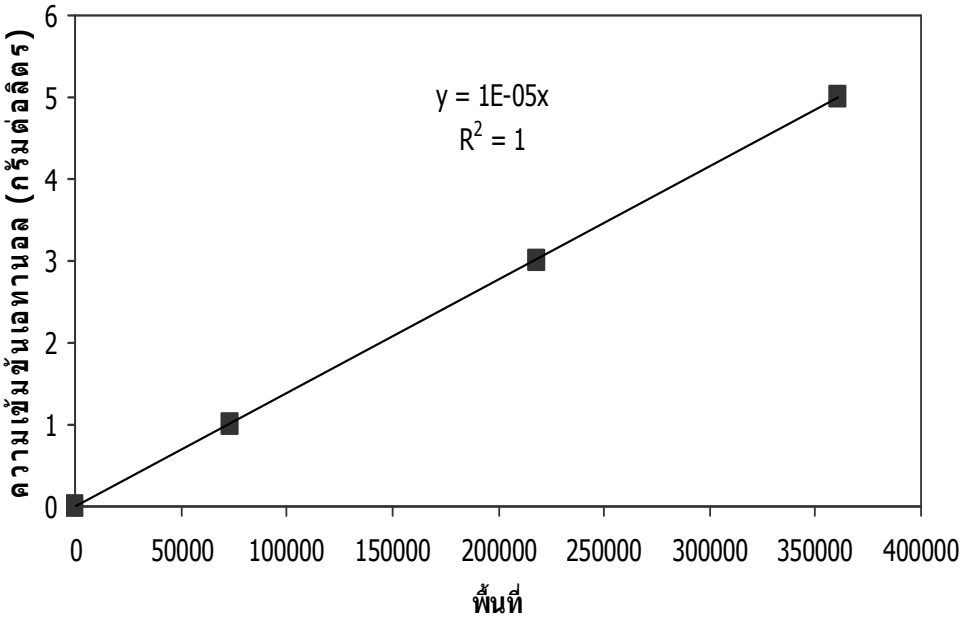
ง.2 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง



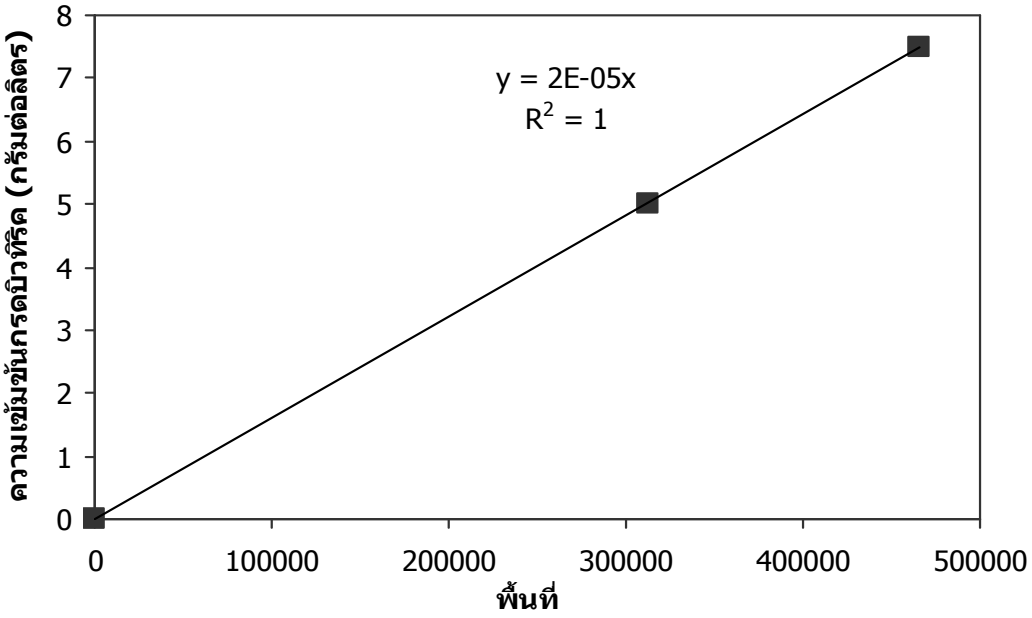
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นบิวทานอล



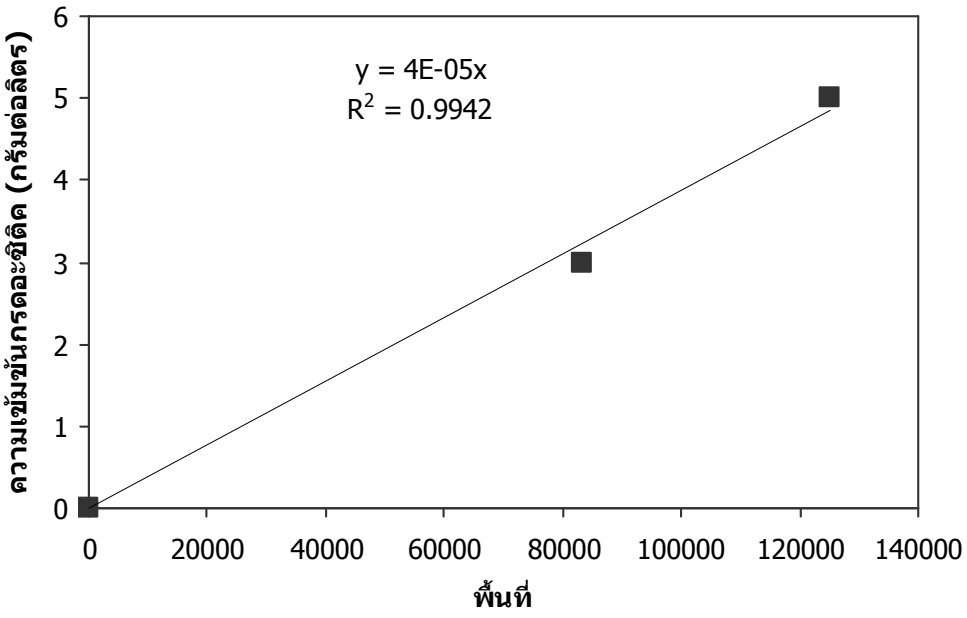
รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นอะซิโตน



รูปที่ ง.3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นเอทานอล



รูปที่ ง.4 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดบิวทิริค



รูปที่ ง.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดบิวทิริค

ภาคผนวก จ

บทความที่ได้รับการตีพิมพ์

Angkhana Sutcharit and Chutimon Satirapipathkul, “Bio-Butanol production from the fermentation of Cassava”, การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 ความร่วมมือทางการวิจัยระหว่างภาคการศึกษาและภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย (Research Cooperation Between Academies and Industries in Thailand) วันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท กาญจนบุรี

การประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19

ความร่วมมือทางการวิจัยระหว่างภาคการศึกษาและภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย

Research Cooperation Between Academies and Industries in Thailand

วันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท กาญจนบุรี

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโยลีอุตสาหกรรม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ได้รับเกียรติให้เป็นเจ้าภาพร่วมกับ

สมาคมวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย

เพื่อจัดการประชุมวิชาการวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19 ประจำปี 2552

ระหว่างวันที่ 26-27 ตุลาคม 2552 ณ เฟลิกซ์ ริเวอร์ แคว รีสอร์ท จ.กาญจนบุรี

Soottitantawat A.	170, 178
Sornthummalee P.	412
Srinophakun P.	440
Srinophakun T.	336, 340, 348, 360, 362, 378
Suaywisate S.	340
Sumanatrakool P.	376, 432
Supaphol P.	21
Suppalakpanya K.	160
Sura-apinan P.	116
Suriye K.	94
Sutanthavibul N.	322
Sutcharit A	60
Suthiprapa J.	322
Suttipitakwong P.	110
Suwanmanee U.	210
Taepaisitphongse V.	406, 410
Tangsathitkulchai C.	344
Tasara J.	254
Teabpinyok N.	156
Thanachayanont C.	64
Thanungkano W.	212
Thongklee H.	402
Thunyawart J.	378
Tiengchad N.	122
Tirawanichakul S.	254
Tirawanichakul Y.	254
Tonanon N.	320
Tongurai C.	160, 162
Tonpoo M.	260
Trirattanapaiboon L.	72
Tubtimdee C.	436
Tungpradabkul S.	68
Udomsangpetch R.	72
Vatthanatham T.	128, 154, 250

Bio-Butanol production from the fermentation of Cassava

Sutcharit A[1], Satirapipathkul C[1,*]

1) Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,

Chulalongkorn University, Patumwan, Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand.

Abstract

In these studies were conducted in order to compare the productivity of butanol (acetone-butanol-ethanol or ABE) fermentation using three strains Clostridium, *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* NRRL B592 and *Clostriduim* sp.8P-2 which screening from soil in Thailand. *C. butylicum* NRRL B592 produced the maximum ABE concentration. At the optimal condition, 35 °C, initial pH 6.5 and 60 g/l initial raw cassava concentration. The culture produced 14.371 g/l ABE, 3.621 g/l acetone, 9.930 g/l butanol and 0.890 g/l ethanol and 0.20 g/l.h of ABE productivity and 0.29 of ABE yield.

1. Introduction

Research has been intensified towards production of alternative fuels such as ethanol and butanol by fermentation in response to increasing price of gasoline and decreasing of foreign oil reserve. Butanol is a superior fuel to ethanol, it has some interesting properties that other fermentation-derived fuels do not have. Butanol has energy content is 30% more than ethanol and is closer to gasoline, its low vapor pressure facilitates its application in existing gasoline supply channels, it is not sensitive to water, is less volatile, less hazardous to handle, less flammable, and can be mixed with gasoline in any proportion [1]. Butanol can be produced from renewable resources such as cassava, molasses and bagasse using the anaerobic bacterium *Clostridium acetobutylicum* or *Clostridium butylicum*. The advantage of using these and some other butanol-producing bacteria is that they can utilize both lignocellulosic hydrolysate sugars (hexoes and pentoses).

2. Materials and Methods

2.1 Culture and cell propagation

C. acetobutylicum ATCC 824, *C. butylicum* NRRL B592 and Clostridium sp. 8P-2 were stored in distilled water at 4 °C. Spores of the cultures were heat shocked at 80 °C for 2 min followed by transferring to Reinforced Clostridium Medium (RCM). The RCM solution was autoclaved at 121 °C for 15 min followed by cooling to 35 °C. The heat-shocked spores were incubated at 35 °C for 16-18 h when it was ready for inoculums development. Cells were grown anaerobically before they were transferred into raw cassava medium.

2.2 Fermentation

Raw cassava was used throughout these studies. One liter of medium was supplemented with K_2HPO_4 (0.5 g), KH_2PO_4 (0.5 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01 g), $MnSO_4 \cdot 3H_2O$ (0.01 g), NaCl (0.01 g) and yeast extract (6 g). The pH was adjusted to 6.5 prior to sterilization. The fermentor was inoculated with 200 mL. of an 72 h old flask culture of the same medium. All experiments were carried out with the following parameters: temperature (room Temp. to 37 °C), initial sugar concentration (40-70 g/L) and no controlling pH.

2.3 Analytical Methods

The reducing suger content was analyzed by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Glucose was assayed by Glucose Analyzer (YSI model 27). Solvent and acids were analyzed by gas chromatography (Shimadzu model GC 7 AG). Cell concentration was estimated by optical density using a predetermined correlation between optical density at 540 nm wavelength and cell dry weight.

ABE productivity was calculated as ABE produced in g/L of broth divided by the fermentation time or the time when fermentation stopped. ABE yield was calculated as g of ABE produced per g of sugar utilized and is expressed in g/g.

3. Results and discussion

3.1 Fermentation of raw cassava

The batch fermentations were carried out in anaerobic flasks to evaluate the ability of different Clostridium sp. to

*Corresponding author(s); Chutimon.s@chula.ac.th

ferment sugars present in raw cassava. The initial raw cassava was ranging from 40 to 70 g/l and the temperature was tested from room temperature to 37 °C. The result is shown in Table 3.1. Although the fermentations were run for 72 h, the strains of *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. butylicum* NRRL B592, and *Clostridium sp.* 8P-2 produced maximum ABE concentrations within 60 h. From Table 3.1, it can be seen that C. butylicum NRRL B592 produced higher concentrations of butanol at 35 °C and 60 g/l raw cassava concentration than other clostridia tested.

3.2 Effect of initial raw cassava concentration

The effect of raw cassava concentration on the ABE fermentation by *C. acetobutylicum* ATTC 824, *C. butylicum* NRRL B592 and *Clostridium sp.* 8P-2 is shown in Fig 3.1a-b. The acetone-butanol-ethanol fermentation of raw cassava was investigated at 35 °C and initial pH at 6.5 and varies the initial raw cassava concentration from 40-70 g/l. Found that the fermentation was run for 72h at 60 g/l initial raw cassava concentration the culture produced 3.621 g/l acetone, 9.930 g/l butanol and 0.890 g/l ethanol, 14.371 g/l total ABE resulting in productivity of 0.20 g/l.h. During the fermentation, ABE yield of 0.29 was achieved.

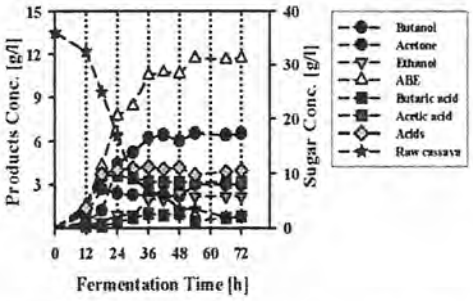


Fig 3.1a Effect of initial raw cassava concentration at 60 g/l, 35°C and initial pH 6.5, uncontrol pH

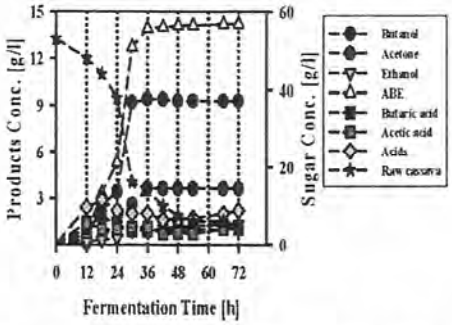


Fig 3.1b Effect of initial raw cassava concentration at 60 g/l, 35°C and initial pH 6.5, uncontrol pH

4. Conclusions

The fermentation of butanol from raw cassava by C. butylicum NRRL B592 is optimized process, the optimal condition is 35 °C, initial pH 6.5 and 60 g/l initial raw cassava concentration which produce maximum ABE concentration, 14.371 g/l (3.621 g/l acetone, 9.930 g/l butanol and 0.890 g/l ethanol) and 0.20 g/l.h of ABE productivity and 0.29 of ABE yield was achieved.

References

[1] N. Qureshi et al., Butanol 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass):recent progress in technology, Biofpr, 2008, 319-329

[2] C. Maungrapol, M. Phisalaphong and P. Sangpangpra, Research and Development of n-Butanol Production Technology from Agricultural Material for Utilization as Alternative Fuel in Internal Combustion Engine., Research, Chulalongkorn University, Thailand 2008

Table 3.1 Effect of Temperature and initial concentration of Glucose on the fermentation of ABE.

Temp. [°C]	C. acetobutylicum ATCC 824				C. butylicum NRRL B592				Clostridium sp. 8P-2			
	Raw cassava conc. [g/l]				Raw cassava conc. [g/l]				Raw cassava conc. [g/l]			
	40	50	60	70	40	50	60	70	40	50	60	70
35	4.895	6.121	8.960	9.376	11.162	11.33	14.371	12.260	6.940	9.524	12.934	12.268
37	6.943	5.623	7.801	8.300	9.857	8.340	10.591	6.549	6.928	7.684	8.576	8.699
room	2.791	6.793	8.718	7.217	8.982	7.940	8.486	6.549	6.928	7.684	8.576	8.699

*Corresponding author(s); Chutimon.s@chula.ac.th

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อังคณา สุจริต เกิดเมื่อวันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2527 ในจังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง เมื่อปี พ.ศ.2545 หลังจากนั้นได้รับปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ. 2550 และได้ศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2551