



# กระบวนการหมักอาซีโตน-บิวทานอล จากมันสำปะหลัง

โดย

จิรกานต์ เมืองนาโท  
ศุวิธนา ทวงเวทีก  
วรรัตน์ อรรถยุกติ  
ชัชฎุทธิ สัตยาประเสริฐ

โครงการวิจัย เลขที่ ๑๑-1R-2527  
ทุนส่งเสริมการวิจัยวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์  
คณะวิศวกรรมศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
กรุงเทพฯ ๑

มีนาคม ๒๕๒๑

ยท  
ยท 15  
004361

กระบวนการหมักอາซีโตน-บิวทานอล จากมันสำปะหลัง

โดย

จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์  
สุวัฒนา พวงเพิกสีก  
วรพจน์ อรรถยุกติ  
ชัยฤทธิ์ สัตยาประเสริฐ



โครงการวิจัย เลขที่ 91 - IR - 2527  
ทุนส่งเสริมการวิจัยวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์  
คณะวิศวกรรมศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
กรุงเทพฯ

มีนาคม 2529



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
รายการตารางประกอบ	ข
รายการรูปประกอบ	ค
บทคัดย่อ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของปัญหา	1
1.2 การสำรวจผลงานวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	7
1.4 ประโยชน์ที่ใคร่รับ	8
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 2 ทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล และการผลิตอาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากการหมัก	
2.1 การเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลโดยวิธี enzyme-enzyme-hydrolysis	9
2.2 การผลิตอาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลจากการหมัก	12
2.3 จลนศาสตร์ของการหมัก	15
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 การแปรรูปแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้วิธี enzyme-enzyme hydrolysis	18

เลขหมู่

04

0415

เลขทะเบียน 004361

วัน, เดือน, ปี 29 ก.พ. 31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 กระบวนการหมักก๊าซไธน-บิวทานอล โดยการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการแปรรูปแป้ง	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง	
4.1 ผลการแปรรูปแป้งมันสำปะหลังและแป้งจากมันสดเป็นน้ำตาลกลูโคส	29
4.2 ผลการหมักน้ำตาลที่ได้จากการแปรรูปแป้ง	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและขอเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
Appendix 1 NOVO ENZYME	49
Appendix 2 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งโดยการแทนที่น้ำ	58
Appendix 3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เครื่อง glucose analyser YSI model 27	60
Appendix 4 การวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลาย, กรด และองค์ประกอบของก๊าซ ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ	62
Appendix 5 ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ และข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ	64
Appendix 6 ข้อมูลการหมัก cassava hydrolysate, dextrose และข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ	67
Appendix 7 ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate แบบต่อเนื่อง	69
Appendix 8 ข้อมูลการคำนวณ $\mu$ และ $v$ ของตัวทำละลาย	70
Appendix 9 ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง	82



### กิจกรรมประกาศ

โครงการนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น ส่วนหนึ่งมาจากความร่วมมือขององค์กร และบุคคลต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. สำนักงานออยและน้ำตาล

1. คุณชนะวุฒิ เสถียรโชค

2. คุณธวัช คินังวัฒนะ

ซึ่งได้ให้ความร่วมมือในการอนุเคราะห์เครื่องวิเคราะห์น้ำตาล

2. บริษัทเอสเอเซียคีก (ประเทศไทย) จำกัด

คุณชมภู กาญจนานทร

ได้ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง

3. ศูนย์เครื่องมือ จุฬาฯ

1. คุณสุณี พดิชธารสิทธิ์

2. คุณสุนันท์ รังษีกาญจนส่อง

3. คุณสุจินดา โรจนศักดิ์โสธร

ได้ให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์ผลผลิตด้วย GC

4. นายเคชา ฉัตรศิริเวช, นายประยุทธ์ พันธุลภ, นายปริญญา เสนาคิสัย,  
นายสมบูรณ์ ภัทรอังกูร และนายลิขิต หาญจางสิทธิ์

นิสิตปริญญาตรีและโท ภาควิชาวิศวกรรมเคมี นายศิริชัย วาสนพิชัย ครูปฏิบัติการ

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ทำหน้าที่ร่วมการดำเนินการวิจัยอย่างจริงจังด้วยดีมาตลอด

5. คุณศิริรัตน์ พุ่มพัดคุณ ช่วยพิมพ์ต้นฉบับตลอดจนรายงานความก้าวหน้าด้วยความ  
ประณีตเรียบร้อย

และที่สำคัญที่สุดคือ คณะกรรมการของสถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์  
ที่ได้ส่งเสริมให้ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับโครงการนี้มาตลอด

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายที่หมักได้, จุลินทรีย์ที่ใช้, เวลาที่ใช้ในการหมัก และ % conversion yield ของสารอาหารชนิดต่าง ๆ	4
2	แสดง Morphology ของ <i>Cl. acetobutylicum</i> ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาที่ใช้ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง	12
3	แสดง % conversion yield ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ	14
4	แสดงอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เกิดขึ้น	14
5	แสดงความเข้มข้นของสารละลายแป้งมันสำปะหลังและแป้งจากมันสด, ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดลองและทฤษฎี, % ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์	30
6	การเปรียบเทียบผลจากการหมัก starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ	32
7	การเปรียบเทียบผลจากการหมัก cassava hydrolysate และ dextrose	39
8	การเปรียบเทียบค่า $\mu$ , $v$ สูงสุดและความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายที่สภาวะต่าง ๆ	40
9	การเปรียบเทียบ % องค์ประกอบของก๊าซที่สภาวะต่าง ๆ	41
10	แสดงผลสรุปของการหมักแบบต่อเนื่อง	43

## รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของอะไมโลส	9
2	แสดงโครงสร้างของอะไมโลเพคติน	10
3	แสดงการย่อยโมเลกุลแป้งโดยใช้ $\alpha$ -amylase และ amyloglucosidase	11
4	แสดง photomicrography ของการเปลี่ยนแปลง Morphology ของ <u>Cl. acetobutylicum</u>	12
5	แสดง metabolic pathway ของ <u>Cl. acetobutylicum</u>	13
6	แสดงเครื่องบดไขมันสำหรับหลัง	19
7	แสดงขั้นตอนการลดขนาดมันสำหรับหลัง	19
8	แสดง $\alpha$ -amylase enzyme, แป้งมันสำหรับหลังและสารละลาย ที่ผ่านการ Liquefaction แล้ว	20
9	แสดงหมอนึ่งอัตโนมัติ	20
10	แสดง AMG enzyme และสารละลายในขณะทำ Saccharification	21
11	แสดงภาพเครื่องวิเคราะห์น้ำตาล glucose analyser model 27 ของ YSI	21
12	แสดง culture flask ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30°C	23
13	แสดงภาพ active inoculum	24
14	แสดง culture tube ที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°C	25
15	แสดงภาพกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องของ starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ	26
16	แสดงภาพกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของ starch hydrolysate	28

ง  
 รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	แสดงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์หมักไคที่อุณหภูมิ 25, 30, 35°C และที่ความเข้มข้นของกลูโคส 30, 50 และ 80 กรัม/ลิตร	31
18	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก starch hydrolysate กับเวลา ที่ pH 4.5	33
19	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก starch hydrolysate กับเวลา ที่ pH 5.5	34
20	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก starch hydrolysate กับเวลา ที่ pH 6.5	35
21	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นรวมของตัวทำละลาย, ความเข้มข้นรวมของกรด, ปริมาตรรวมของก๊าซที่ pH 4.5, 5.5, 6.5	36
22	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก Cassava hydrolysate กับเวลา ที่ pH 6.5	37
23	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก dextrose กับเวลา ที่ pH 5.5	38
24	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ไคจากการหมัก starch starch hydrolysate แบบต่อเนื่อง กับเวลา ที่ pH 6.5	42

สถาบันวิจัยประชากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



๑  
บทคัดย่อ



มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศไทย ปัญหามันสำปะหลังล้ม  
ตลาด ทำให้ภาครัฐบาลมีนโยบายที่จะพัฒนาพืชเศรษฐกิจภายในประเทศไปเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม  
บิวทานอลเป็นเคมีภัณฑ์อย่างหนึ่งที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยใช้มันสำปะหลัง ปัจจุบันเรา  
ใช้บิวทานอลเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และมีแนวโน้มที่จะนำบิวทานอลมาใช้เป็น  
เชื้อเพลิง ทั้งในเครื่องยนต์เบนซินและเครื่องยนต์ดีเซล

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตตัวทำละลาย (บิวทานอล-อาซีโตน-เอทานอล) จากการ  
หมักแบบไม่ต่อเนื่องและแบบต่อเนื่อง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและมันสดเป็นวัตถุดิบ ชั้นแรกแป้งมัน  
สำปะหลังและมันสดถูกไฮโดรไลส์ไปเป็นน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นจึงทำการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้  
โดยใช้แบคทีเรีย C1 butylicum NRRL B592 จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของ  
การหมักแบบไม่ต่อเนื่องของแป้งมันสำปะหลังและมันสด พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 - 35°C pH 5.5-  
6.5 และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการหมัก 50 กรัม/ลิตร ให้ความเข้มข้นรวมของ  
ตัวทำละลายเท่ากับ 12.56, 14.64 กรัม/ลิตร ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและ  
อัตราการสร้างตัวทำละลายจำเพาะของแป้งมันสำปะหลังและมันสดเท่ากับ 0.247, 0.174 ชั่วโมง<sup>-1</sup>  
และ  $0.090 \times 10^{-12}$ ,  $0.032 \times 10^{-12}$  กรัม/จำนวนเซลล์-ชั่วโมง ตามลำดับ และยังพบว่า  
การหมักแบบต่อเนื่องให้ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลาย 2.9 กรัม/ลิตร ด้วยอัตราการผลิต  
0.44 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง 2.2 เท่า ที่สภาวะการ  
หมักเดียวกัน

สถาบันวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ABSTRACT

Cassava is one of the economical agricultural feedstocks in Thailand. The problem of the surplus raw cassava initiated the Thai-Government to change the policy of sending raw material aboard to urge producing industrial products instead. Butanol is one of the chemical products which can be obtained by the fermentation of cassava. Now a day, butanol is broadly used as the solvent in many chemical processes, and the tendency of using with gasoline engine or diesel engine seems promising.

In our research, the production of solvent (butanol-acetone-ethanol) by batch and continuous fermentation of cassava starch and raw cassava has been studied. Firstly, they were hydrolysed to yield glucose. Then the hydrolysed glucose was fermented by *Cl. butylicum* NRRL B592. The experimental results for defining the optimum conditions in batch fermentation of cassava starch and raw cassava have showed that the temperature range of 30-35°C, pH range of 5.5-6.5 and initial glucose concentration of 50 g/l was optimal. Yielding solvent concentration were 12.56, 14.64 g/l respectively. Specific growth rate and specific rate of solvent formation of cassava starch and raw cassava were 0.247, 0.174 hr<sup>-1</sup> and 0.09 x 10<sup>-12</sup>, 0.032 x 10<sup>-12</sup> g/cell-hr. respectively. It also has been found that the solvent productivity from continuous fermentation were 2.2 time greater than that of the batch fermentation at the same optimum condition (ie. 2.9 g/l of solvent concentration, 0.44 g/l-hr of productivity).



## 1.1 ความเป็นมาของปัญหา

ปัญหาการขาดแคลนพลังงานเป็นปัญหาที่ทั่วโลกให้ความสนใจเป็นอันมาก ดังเห็นได้จากแนวโน้มการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนจากคานต่าง ๆ เช่น พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานจากความร้อนใต้พิภพ พลังงานชีวมวล ฯลฯ มาใช้แทนพลังงานจากน้ำมันดิบ นอกจากนี้ปัญหาการขาดแคลนพลังงานจากน้ำมันดิบอันอาจจะเกิดขึ้นในอนาคตอันใกล้แล้ว สำหรับประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม มีพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว มันสำปะหลัง ข้าวโพด ฯลฯ เป็นรายได้หลักของประเทศ ในปัจจุบัน ปัญหามันสำปะหลังล้นตลาด ทำให้ภาครัฐบาลมีนโยบายที่จะพัฒนาพืชเศรษฐกิจเหล่านี้ไปเป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม การผลิตอะซีโตน-บิวทานอล จากมันสำปะหลังจึงเป็นการตอบสนองนโยบายดังกล่าว

บิวทานอลจัดเป็นแอลกอฮอล์หนัก ซึ่งสามารถผลิตได้จากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมีหรือจากชีวมวล ในการผลิตจากผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี (1) ใช้วัตถุดิบ เช่น โพลีลีน ทำปฏิกิริยา oxoreaction และ Hydroformylation ทำให้ได้ iso-butanol และ n-butanol ในอนาคต เมื่อเกิดการขาดแคลนน้ำมันดิบ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์บิวทานอลด้วยกระบวนการปิโตรเคมีอาจต้องยุติลง ดังนั้นการผลิตบิวทานอลจากชีวมวล เช่น มันสำปะหลัง จึงอาจจะเป็นกระบวนการที่มีความเป็นไปได้

การผลิตบิวทานอลจากมันสำปะหลัง จะต้องผ่านกรรมวิธีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาลที่เรียกว่าไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (2)(3)(4) ก่อน ต่อจากนั้นจะเป็นกระบวนการหมัก (Fermentation) เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นบิวทานอล ซึ่งจะได้อะซีโตนและเอทานอลเป็น co-product (5) เราเรียกผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ตัว รวมกันว่า "ตัวทำละลาย" (solvent)

บิวทานอลและอะซีโตนนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมโดยเป็นตัวทำละลายเป็นสารเคมี ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อใช้บิวทานอลเป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องยนต์เพื่อแทนที่สารตะกั่ว ทำให้สามารถลดปัญหามลพิษตะกั่วจากเครื่องยนต์ลงได้ จากรายงานการวิจัยเรื่อง

"การวิจัยเพื่อนำแอลกอฮอล์กลับมาใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์สันดาปภายใน" โดย รศ.โกวิท ศตวุฒิ และ รศ.อิทธิพล ปานงาม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (6) ได้สรุปการวิจัยว่าบิวทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ทั้งในเครื่องยนต์เบนซินและเครื่องยนต์ดีเซล

นอกจากนี้ จากรายงานการวิจัยเรื่อง "โครงการวิจัยเติมสารเสริมในแอลกอฮอล์เพื่อใช้แทนน้ำมันดีเซล" โดย พลเรือตรี เบญจ ภมรสุต และคณะ (7) ยังได้สนับสนุนการใช้บิวทานอลในเครื่องยนต์ดีเซล

## 1.2 การสำรวจผลงานวิจัย

### 1.2.1 ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการไฮโดรไลซิสเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล

ในปัจจุบันการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลนิยมใช้วิธี Enzyme-enzyme hydrolysis โดยใช้ NOVO ENZYME (4) (ดู Appendix I) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1. Liquefaction เป็นการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ คือ maltodextrins, oligosaccharide โดยใช้  $\alpha$  - amylase enzyme

2. Saccharification เป็นการย่อยสลายสารที่ได้จากขั้นตอนแรกให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ amyloglucosidase enzyme

### 1.2.2 ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตบิวทานอล-อาซีโตน โดยการหมัก

PASTEUR (8) เป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสที่ค้นพบแบคทีเรีย ที่ให้ผลผลิตเป็นบิวทานอลเป็นครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1862 ต่อมาในปี 1912 DR. WEIZMANN สามารถแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงได้สำเร็จ และให้ชื่อว่า Clostridium acetobutylicum แบคทีเรียนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นอาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล

ในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ได้มีการผลิตอาซีโตนในระบับอุตสาหกรรมจากระบวนการหมักเพื่อใช้ในกิจการการทำวัตถุระเบิด ส่วน butanol นั้น ต่อมาได้มีการพัฒนาไปเป็น butyl-nitrate ซึ่งเป็นสารละลายที่ดีเยี่ยมสำหรับ nitrocellulose lacquer นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมยางสังเคราะห์

ในปัจจุบัน การผลิตบิวทานอลโดยกระบวนการหมักถูกแทนที่ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางปิโตรเคมี ทำให้ได้บิวทานอลในราคาที่ถูกลงกว่า ยกเว้นประเทศแอฟริกาใต้ประเทศเดียวเท่านั้นที่ยังคงผลิตบิวทานอลโดยการหมักในระบับอุตสาหกรรม (8)

ปัญหาของการผลิตบิวทานอลจากกระบวนการหมักที่สำคัญคือ กระบวนการนี้ให้ % conversion yield ค่อนข้างต่ำ (ประมาณ 30%) (8) ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายที่ได้ (acetone-butanol-ethanol) ประมาณ 20 กรัม/ลิตร (8) ทำให้สูญเสียพลังงานเพื่อใช้ในการกลั่นแยกเป็นจำนวนมาก จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้นักวิจัยส่วนมากมุ่งที่จะคิดค้นเพื่อพัฒนากระบวนการหมักนี้ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น องค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมีดังต่อไปนี้

#### 1.2.2.1 สารอาหาร (Substrate) และ Clostridium ชนิดต่าง ๆ

สารอาหารที่สำคัญที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตบิวทานอลมีมากมายหลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส (9), อากาน้ำตาล (10), น้ำตาลนม (9), Topinambour (11), Hemicellulose hydrolysate (12), และ pentose จากการ hydrolyse ช่างข้าวโพด (13) (ดูตารางที่ 1)

#### 1.2.2.2 อิทธิพลของ Inoculum ต่อการหมัก

โดยปกติจุลินทรีย์ Clostridium จะถูกเก็บไว้ในรูปของสปอร์ เมื่อนำมา propagate ใหม่ โดยทั่ว ๆ ไปจะทำ heat shock (เช่น แช่ในน้ำร้อน 80°C เป็นเวลา 1-3 นาที) ROSS (14) ได้รายงานว่า การทำ heat shock จะช่วยทำลายเมกที่เรียที่อ่อนแอและเร่งการ germination ของสปอร์ การเตรียม Inoculum ที่ดีเพื่อ Inoculate ลงในถังหมัก ควร propagate หลาย ๆ ครั้ง เพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ที่ active ทำให้สามารถลดเวลาการหมักลงได้ (15)

#### 1.2.2.3 การเชื่อมโยงระหว่างการเกิดสปอร์และการเกิดตัวทำละลาย อาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล

GOTTSCHAL และ MORRIS (16) ได้ศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องด้วยน้ำตาลกลูโคส เมื่อมีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน เขาพบว่า ตัวทำละลายอาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล เกิดขึ้นในช่วงการเปลี่ยนรูปเมกที่เรียจากแบบแห้งเป็นแบบมีสปอร์ภายใน (endospore) ROBSON และ JONES (17) ได้ศึกษา mutant ของ Clostridium พบว่า Clostridium ที่มีรูปร่างแบบแห้ง ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ตัวทำละลายในขณะที่ Clostridium ที่มีรูปร่าง "cigar" (ก่อนเปลี่ยนรูปเป็นแบบ endospore) สามารถให้ตัวทำละลายได้ GEORGE และ CHEN (18) ได้ศึกษาการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้ *Cl. butylicum* ที่ pH 6.8 เขาพบว่าจุลินทรีย์ยังคงมีรูปร่างแบบแห้ง ในขณะที่ตัวทำละลายเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายทั้งหมดได้, จุลินทรีย์ที่ใช้, เวลาที่ใช้ในการหมักและ % conversion yield ของสารอาหารชนิดต่าง ๆ

สารอาหาร	จุลินทรีย์	ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายทั้งหมดได้ (กรัม/ลิตร)	เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชม.)	% conversion yield
น้ำตาลกลูโคส	<i>Cl. butylicum</i>	14.1	110	28.2
น้ำตาลนม	NRRL:B592	10.2	115	20.4
Topinambour	<i>Cl. acetobutylicum</i> IFP 904	22.4	36	31.5
กากน้ำตาล	<i>Cl. acetobutylicum</i> strain selection	16-18	30-60	31-32
Hemicellulose-hydrolysate				
Cellobiose		5.74	48	30.7
Mannose	<i>Cl. acetobutylicum</i> ATCC 824	4.28	48	25.3
Arabinose		1.64	48	15.2
Xylose		1.31	48	10.7
Galactose		0.56	48	4.8
ข้าวโพค		20.6	40	-
Pentose จากการ hydrolyse ข้าวโพค	<i>Cl. acetobutylicum</i>	13.5	48	-

#### 1.2.2.4 Autolysin

ในระยะเวลาเจริญเติบโตและสร้างชีวมวลอย่างรวดเร็ว (Log phase) Cl. acetobutylicum จะสร้าง autolysin ขึ้น และตรึงติดกับผนังเซลล์ เมื่อถึงระยะสุดท้ายของ log phase autolysin นี้จะถูกปล่อยออกสู่ fermentation broth ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นี้ (19)

#### 1.2.2.5 อิทธิพลของเกลือแร่ต่าง ๆ ในอาหารเสริม

GOTTSCHALK (20) ได้ศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้กลูโคสเป็นสารอาหาร เมื่อมีการจำกัดปริมาณฟอสเฟต เขาพบว่า การหมักแบบต่อเนื่องนี้ให้ผลผลิตบิวทานอล = 0.5 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1 ปี ส่วนเกลือแร่ตัวอื่น ๆ เช่น

แคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า ทำให้มีปริมาณการผลิตตัวทำละลายต่ำ แต่เพิ่มปริมาณกรดบิวทริก และกรดอะซิติก (21)

แมกนีเซียม มีบทบาทสำคัญในการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 50-200 มิลลิกรัม/ลิตร (22)

แมงกานีส มีผลต่อการเจริญเติบโตของ Clostridium ปริมาณที่เหมาะสมคือ 0-20 มิลลิกรัม/ลิตร ถ้าปริมาณแมงกานีสมากกว่านี้ จะกลายเป็นตัวยับยั้งการสร้างบิวทานอล (22)

โปแตสเซียม มีบทบาทต่อการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.6-0.8 กรัม/ลิตร ถ้าปริมาณมากกว่านี้จะทำให้ได้กรดมากขึ้น และตัวทำละลายน้อยลง (22)

สารประกอบแอมโมเนียม ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างชีวมวลของ Clostridium ปริมาณที่เหมาะสมคือ 1.1 - 2.2 กรัม/ลิตร การเติมสารประกอบแอมโมเนียมมากเกินไปจะทำให้ได้กรด (22)

วิตามิน วิตามินที่จำเป็นได้แก่ Biotin จำนวน 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

p - Aminobenzoic จำนวน 1 มิลลิกรัม/ลิตร

วิตามินทั้ง 2 ชนิดนี้มีอยู่ในยีสต์สกัด (yeast extract) (21, 10)

### 1.2.2.6 อิทธิพลของ pH ต่อการหมัก

pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Clostridium* ค่อนข้างจะไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และกระบวนการที่ใช้ (23, 24, 25, 26)

### 1.2.2.7 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมัก

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล จากการหมักพบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 29 ถึง 35 °C (14)

C.E. VOGET, C.F. MIGNONE และ R.J. ERTOLA (27) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักเพื่อให้ได้ตัวทำละลายจาก whey พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 30 °C และ 37 °C ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้

B. MCMEIL และ B. KRISTIAKSEN (18) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของ *Cl. acetobutylicum* โดยใช้กลูโคสเป็นสารอาหาร พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 35 °C

### 1.2.2.8 อิทธิพลของการกวน (Agitation)

L. YERUSHALMI และ B. VOLESKY (29) ได้ศึกษาอิทธิพลของการกวนในถังหมักเพื่อผลิตตัวทำละลายโดยใช้กลูโคสเป็นสารอาหาร พบว่าอัตราการผลิตตัวทำละลายจำเพาะ (specific rate of solvent production) เพิ่มขึ้นตามอัตราการหมุนของใบพัดจาก 190 ถึง 340 rpm ( $N_{Re} = 3.93 \times 10^4$ ) ค่าสูงสุดของอัตราการผลิตจำเพาะของบิวทานอล, อะซีโตน, เอทานอล = 5.54, 3.85 และ 0.8 mmol/h ตามลำดับ และจะมีค่าลดลงจนมีค่า = 0 เมื่อเพิ่มอัตราการหมุนของใบพัดจนถึง 560 rpm.

### 1.2.2.9 อิทธิพลของความดันภายใต้บรรยากาศ $CO_2$ ต่อกระบวนการหมักโดยใช้

#### *Cl. acetobutylicum*

E.K. HERBERT และ D.W. SUNDSTROM (30) ได้ศึกษาผลของการแปรเปลี่ยนความดันภายใต้บรรยากาศ  $CO_2$  ระหว่าง 0-100 psig ในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้กลูโคสเป็นสารอาหาร พบว่า ผลผลิตสูงสุดของตัวทำละลายที่เกิดขึ้นอยู่ที่ 25 psig โดยมีค่าความเข้มข้นของบิวทานอลประมาณ 7 กรัม/ลิตร และจะเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างบิวทานอล/อะซีโตน จาก 5/1 ไปเป็น 20/1 ที่ความดัน 40 psig.



### 1.2.2.10 การเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายโดยใช้เทคนิคการตรึงจุลินทรีย์

C. MUANGNAPOH และ G. GOMA (31) ได้ศึกษาผลของการหมักโดยใช้เทคนิคการตรึงจุลินทรีย์ลงบนหินปูนภูเขาไฟ ซึ่งอยู่ในถังหมักตัวที่สอง ซึ่งต่อแบบอนุกรมกับถังหมักตัวแรก พบว่า สามารถเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายได้ถึง 0.75 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง ในสภาวะอาหารเสริมจำกัด

L. HÄGGTROM และพวก (32) ได้ศึกษาผลของการหมักโดยใช้เทคนิคการตรึงสปอร์ของ Cl. acetobutylicum ลงใน Ca - alginate พบว่าสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตของบิวทานอลได้ถึง 0.48-0.64 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

### 1.2.2.11 การเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายโดยใช้เทคนิค Ultrafiltration และ Reverse Osmosis

M. MINIER และพวก (33) ได้ศึกษาผลของการหมักโดยใช้เทคนิค Ultrafiltration ร่วมกับถังหมัก พบว่าสามารถเพิ่มอัตราผลผลิตตัวทำละลายได้ถึง 1.2 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง

G. ALBERT และ L. I. ENGEL (34) ได้ศึกษาผลการใช้เทคนิค Ultrafiltration กับ Reverse osmosis เพื่อแยกบิวทานอล, อาซีโตน ออกจาก fermentation broth โดยผ่านแผ่นเยื่อบาง ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

## 1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการหมักโดยกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและแบบต่อเนื่อง เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการหมักโดยใช้เทคโนโลยีที่สูงขึ้น

1.3.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม (Optimal condition) ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้มันสำปะหลังสด และแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

1.3.3 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยอาศัยผลที่ได้จากการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

#### 1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1.4.1 เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุการเกษตรที่มีจำนวนมากและราคาถูก
- 1.4.2 ได้ข้อมูลสำหรับปรับปรุงพัฒนากระบวนการหมัก (high bioprocess technology)
- 1.4.3 ได้ข้อมูลสำหรับการผลิตบิวทานอลโดยการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

#### 1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.5.1 ศึกษาข้อมูลคุณสมบัติแป้งมันสำปะหลังและวิธีวิเคราะห์
- 1.5.2 ออกแบบและจัดตั้งเครื่องมือวิจัย
- 1.5.3 ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตบิวทานอลจากการหมักแบบ  
ไม่ต่อเนื่อง
- 1.5.4 ทำการหมักแบบต่อเนื่องโดยอาศัยข้อมูลจากข้อ 1.5.3
- 1.5.5 สรุปผลการวิจัย
- 1.5.6 ตีพิมพ์และเผยแพร่

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทฤษฎีการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล

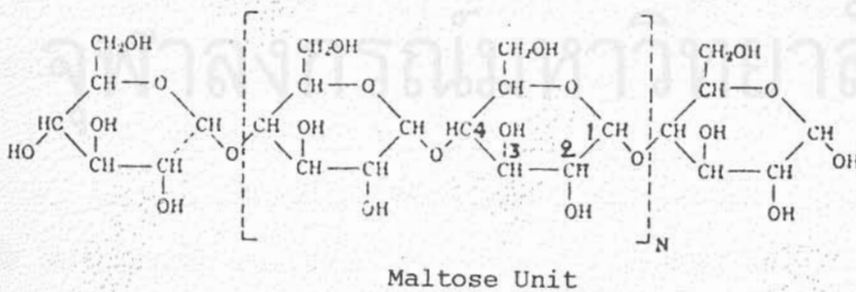
และการผลิตอาซิโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากการหมัก

2.1 การเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลโดยวิธี enzyme-enzyme hydrolysis

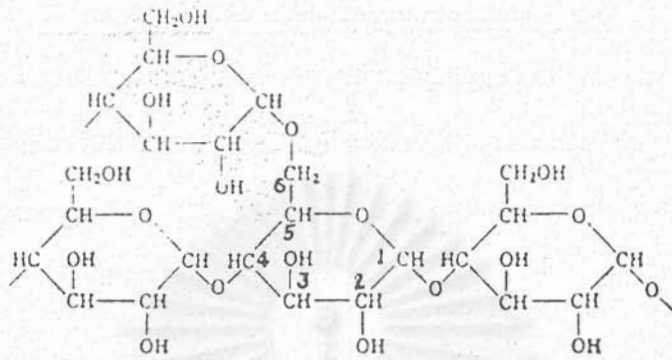
2.1.1 แป้ง จัดเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีสูตรทั่วไปคือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  โดยปกติแป้งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ อยู่ในเมล็ด, ราก และลำต้นของพืช แป้งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.1.1.1 อะไมโลส (amylose) ประกอบด้วย D-glucose unit ประมาณ 500-2000 unit (35) ยึดต่อกันเป็นโซ่ยาว (แบบไม่มีแขนง) ด้วย  $\alpha$ -glycosidic linkage หรือ 1, 4  $\alpha$ -glycosidic linkage คูรูปที่ 1 โดยทั่วไป อะไมโลส จะเป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ มีอยู่ในแป้งประมาณ 20-25% ของแป้งทั้งหมด น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 8000

2.1.1.2 อะไมโลเพคติน (amylopectin) มีโครงสร้างเป็นแบบแขนงและแบบโซ่รวมกัน แบบโซ่จะยึดต่อกันด้วย  $\alpha$ -glycosidic linkage แบบแขนงซึ่งมี D-glucose unit อยู่ประมาณ 20-25 unit จะยึดต่อกันด้วย 1, 6 -  $\alpha$ -glycosidic linkage คูรูปที่ 2 อะไมโลเพคตินปกติไม่ละลายน้ำ มีอยู่ประมาณ 75-80% ของแป้งทั้งหมด น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1,000,000 ขึ้นไป



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของอะไมโลส



รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของอะไมโลเพคติน

มันสำปะหลัง เป็นพืชที่ปลูกง่าย ให้ผลผลิตเร็ว ส่วนประกอบของมันสำปะหลังมีดังนี้

แป้ง (starch)	20-30 %
ความชื้น (moisture)	60-75 %
โปรตีน (protein)	0.7-3 %
เซลลูโลส (cellulose)	2 %
น้ำและแร่ธาตุอื่น ๆ	

2.1.2 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์เป็นสารที่สกัดได้จากสิ่งมีชีวิต มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 50,000 หรือมากกว่า ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน มีคุณสมบัติเป็นชีวคะตาลีสต์ เอนไซม์สามารถเสื่อมคุณภาพ (denature) ได้เมื่ออยู่ในสภาวะเช่น อุณหภูมิ, สารเคมี, pH ฯลฯ ที่ไม่เหมาะสม สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้เอนไซม์

2 ชนิดด้วยกันคือ

2.1.2.1 อัลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) (4)

$\alpha$ -amylase เป็นเอนไซม์ที่สกัดมาจากแบคทีเรียบาซิลลัสซับติลิส (Bacillus subtilis) และบาซิลลัสไลเคนนิฟอร์มิส (Bacillus licheniformis) ใช้สำหรับไฮโดรไลสโมเลกุลของแป้งตรงตำแหน่ง 1, 4 alpha-glucosidic linkage ทำให้ได้ maltodextrin, oligosaccharide.  $\alpha$ -amylase มีชื่อทางการค้าแตกต่างกันไปตามบริษัทผู้ผลิต เช่น NOVO ENZYME

จะมีชื่อว่า Termamyl 60L, 120L เป็นต้น (ดู Appendix I)

2.1.2.2 อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) (4)

หรือ AMG เป็นเอนไซม์ที่สกัดมาจากราคาแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ (Aspergillus Niger) ใช้สำหรับไฮโดรไลส maltadextrin และ oligosaccharide ตรงตำแหน่ง 1, 4 และ 1, 6 alpha-glucosidic linkage ทำให้ได้ glucose unit ชื่อทางการค้าคือ AMG 200L, AMG 300L (ดู Appendix I)

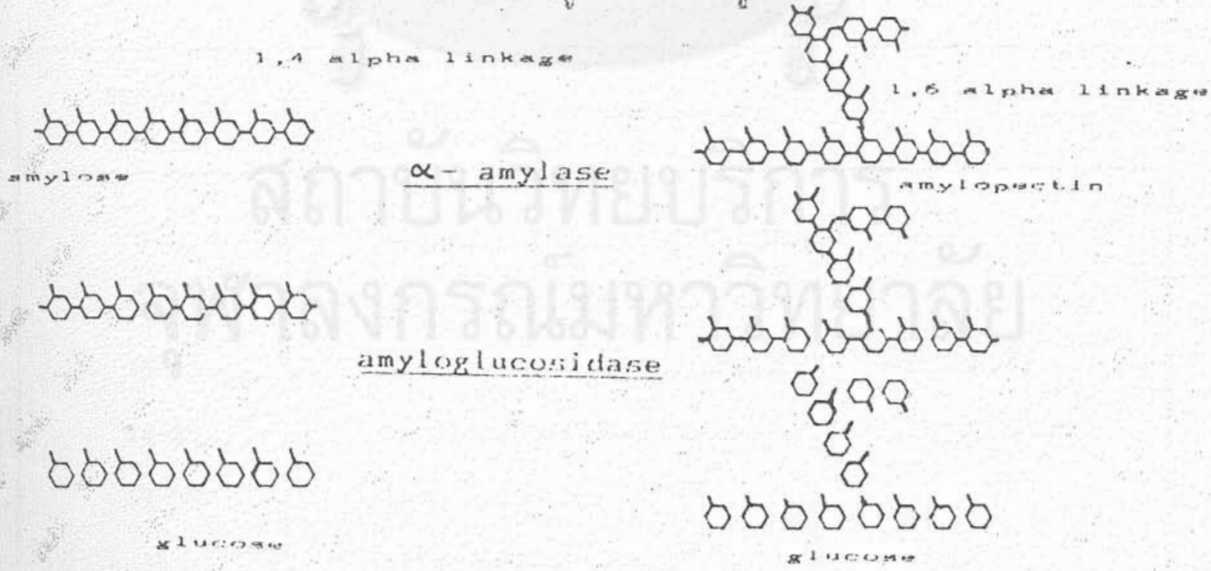
2.1.3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล โดยวิธี Enzyme-enzyme hydrolysis ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.1.3.1 Liquefaction เป็นกระบวนการย่อยแป้งให้เป็น maltadextrin และ Oligosaccharide โดยใช้  $\alpha$  - amylase enzyme ที่ pH, ความเข้มข้นของ enzyme และอุณหภูมิตามที่กำหนด (ดู Appendix I)

2.1.3.2 Saccharification เป็นกระบวนการย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ

2.1.3.1 ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ amyloglucosidase enzyme ตามปริมาณและสภาวะที่กำหนด (ดู Appendix I)

ลักษณะการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลกลูโคส แสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงการย่อยโมเลกุลแป้ง โดยใช้  $\alpha$  - amylase และ amyloglucosidase

2.2 การผลิตอาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล จากการหมัก

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

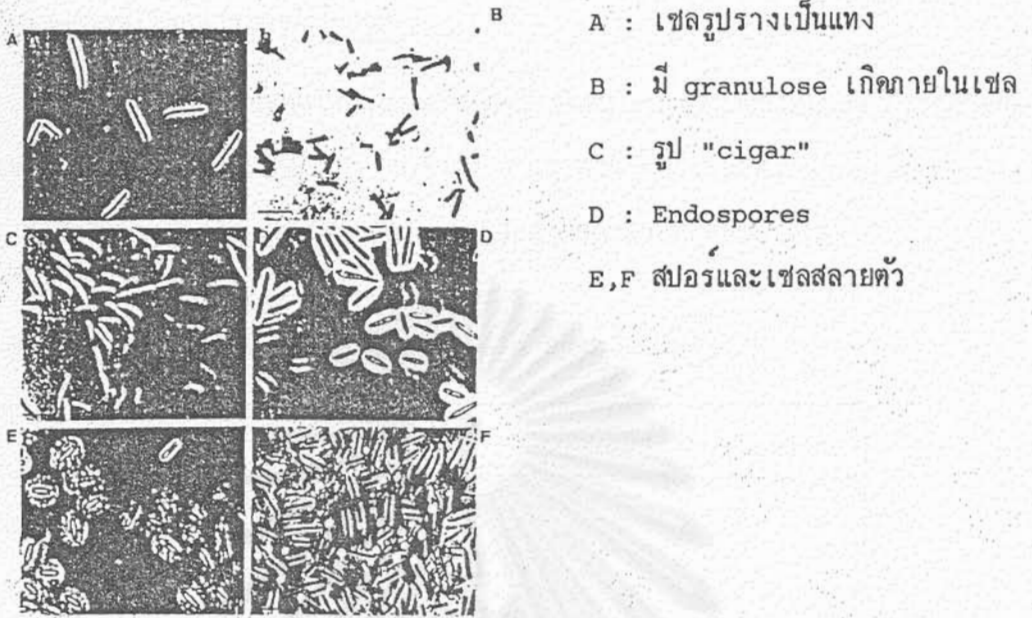
Cl. acetobutylicum เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่งขนาดยาว 4 μm เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 μm เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella รอบ ๆ เซลล์ สร้าง endospore รูปไข่ (oval) มีตำแหน่งของ endospore ค่อนข้างปลายเซลล์ข้างใดข้างหนึ่ง ลักษณะโคโลนีเป็นแบบกลม ขอบไม่เรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม. สีของโคโลนีเป็นสีครีมผิวเป็นมันและโปร่งแสง เจริญได้ดีในอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตแบบเดี่ยวหรือแบบโพลีเมอร์ สามารถใช้ในโตรเจนโดยตรงด้วยการตรึงไนโตรเจน หรือใช้เกลือแอมโมเนียม กรดอะมิโน เป็นแหล่งให้ไนโตรเจน เจริญได้ดีอุณหภูมิ 29-35°C pH ระหว่าง 4.5-6.8 ในสภาวะไร้ออกซิเจน

2.2.2 Morphology

ในระหว่างการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง Cl. acetobutylicum จะมี morphology ที่แตกต่างกันไปตามอายุของแบคทีเรีย ตารางที่ 2 และรูปที่ 4 แสดง Morphology ของ Cl. acetobutylicum ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาที่ใช้ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ 2 แสดง Morphology ของ Cl. acetobutylicum ที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาที่ใช้ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	Morphology
0-10	vegetative cell มีรูปร่างเป็นแท่ง
10-15	เซลล์เริ่มแบ่งตัว มีขนาดยาว เคลื่อนที่ได้เร็ว
15-18	เซลล์มีขนาดสั้นลง มีลักษณะเหมือนกันหมด เคลื่อนที่ได้เร็ว
18-25	เซลล์บางตัวมีรูปร่างแบบ "cigar" เซลล์ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่
25-35	เกิด endospore
35	เซลล์ตายตัวเหลือแต่สปอร์

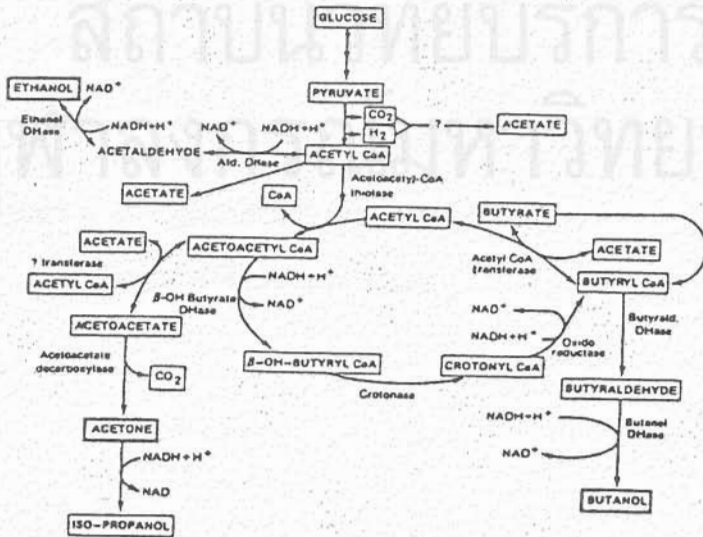


A : เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง  
 B : มี granulose เกิดภายในเซลล์  
 C : รูป "cigar"  
 D : Endospores  
 E, F สปอร์และเซลล์สลายตัว

รูปที่ 4 แสดง photomicrography ของการเปลี่ยนแปลง Morphology ของ Cl. acetobutylicum (36)

2.2.3 ชีวเคมีของกระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล โดยการหมัก

กลูโคสถูกเมตาบอลไลท์ไปเป็น pyruvate โดยกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). หลังจากนั้น pyruvate ถูกเปลี่ยนไปเป็น acetyl-CoA พร้อมกับไทกาซ  $H_2$ ,  $CO_2$  ออกมา จาก acetyl-CoA ซึ่งเป็นตัวกลางในการเมตาบอลไลท์ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือตัวทำละลาย (butanol-acetone-ethanol) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5



รูปที่ 5 metabolic pathway ของ Cl. acetobutylicum (37)

#### 2.2.4 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก

จากข้อ 2.2.3 แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักนั้น ประกอบด้วย คั่วทำละลาย, กรด, ก๊าซและชีวมวล ตารางที่ 3 และตารางที่ 4 แสดง % conversion yield ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และแสดงอัตราส่วนของคั่วทำละลายที่เกิดขึ้น (10)

ตารางที่ 3 แสดง % conversion yield ของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์	% conversion yield
CO <sub>2</sub>	57
H <sub>2</sub>	2
บิวทานอล-อาซีโตน-เอทานอล	32
ชีวมวล	6
กรดอะซิติกและบิวทิริก	2
อื่น ๆ	1

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนของคั่วทำละลายที่เกิดขึ้น

% บิวทานอล	% อาซีโตน	% เอทานอล
59	38	3
67	30	3

โดยทั่วไป อัตราส่วนของคั่วทำละลาย = 6:3:1

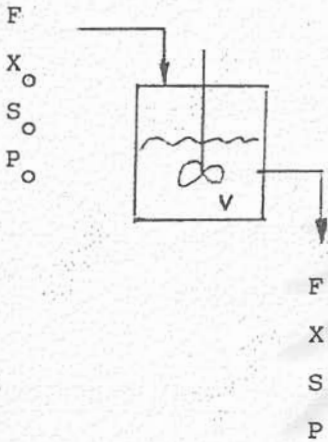
(บิวทานอล:อาซีโตน:เอทานอล)





### 2.3 จลนศาสตร์ของการหมัก (Kinetic of fermentation)

จากรูปถังหมักเดี่ยว



ให้  $F$  : เป็นอัตราการไหลเข้า-ออก ของสารละลาย  
อาหาร (ลิตร/ชั่วโมง)

$X_0, X$  : เป็นค่าความเข้มข้นของชีวมวลในสารละลาย  
อาหารที่เข้าออกถังหมัก (กรัม/ลิตร)

$S_0, S$  : เป็นค่าความเข้มข้นของสารละลายอาหารที่  
เข้าออกถังหมัก (กรัม/ลิตร)

$P_0, P$  : เป็นค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ในสารละลาย  
อาหารที่เข้า-ออกถังหมัก (กรัม/ลิตร)

$V$  : เป็นปริมาตรของสารละลายในถังหมัก (ลิตร)

#### สมการสมดุลเชิงชีวมวล

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{F}{V} X_0 - \frac{F}{V} X - \alpha X \quad (1)$$

อัตราการสะสมชีวมวล = อัตราการเกิดชีวมวล + อัตราการไหลของชีวมวลเข้าสู่  
ถังหมัก - อัตราการไหลของชีวมวลที่ออกจากถังหมัก -  
อัตราการตายของชีวมวล

เมื่อ  $\mu$  = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) ชั่วโมง<sup>-1</sup>

$\alpha$  = อัตราการตายจำเพาะ (specific death rate) ชั่วโมง<sup>-1</sup>

#### สมการสมดุลเชิงผลิตภัณฑ์

$$\frac{dP}{dt} = \nu X + \frac{F}{V} P_0 - \frac{F}{V} P - KP \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{อัตราการสะสมผลิตภัณฑ์} &= \text{อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์} + \text{อัตราการไหลของผลิตภัณฑ์ที่เข้าสู่ถังหมัก} \\ &- \text{อัตราการไหลของผลิตภัณฑ์ที่ออกจากถังหมัก} - \text{อัตราการสลายตัว} \\ &\text{ของผลิตภัณฑ์} \end{aligned}$$

เมื่อ :

$v$  = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific rate of product formation) กรัมผลิตภัณฑ์/กรัมชีวมวล-ชั่วโมง

$k$  = อัตราการสลายตัวของผลิตภัณฑ์ (rate of product destruction) ลิตร/ชั่วโมง

สมการสมดุลเชิงอาหาร

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu x}{Y_{x/s}} + \frac{F}{V} S_0 - \frac{F}{V} S - mx - \frac{vx}{Y_{p/s}} \quad (3)$$

อัตราการสะสมอาหาร = อัตราการใช้อาหาร + อัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ถังหมัก - อัตราการไหลของอาหารออกจากถังหมัก - อัตราการใช้อาหารเพื่อยังชีพ - อัตราการใช้อาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

เมื่อ  $Y_{x/s}$  = conversion yield of substrate to biomass

$Y_{p/s}$  = conversion yield of substrate to product

$m$  = อัตราการยังชีพจำเพาะ specific rate of maintenance, กรัมของอาหาร/กรัมชีวมวล-ชั่วโมง

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง  $F = 0$

สมมุติฐานเมื่อสารละลายอาหารที่เข้าสู่ถังหมักปลอดเชื้อ  $x_0 = 0$

ผลิตภัณฑ์ในสารละลายอาหารที่เข้าสู่ถังหมัก  $p_0 = 0$

ในสภาวะที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว  $\mu \gg \alpha$

ในสภาวะการสร้างผลิตภัณฑ์  $v \gg k$

ในสภาวะการใช้อาหาร  $mx \ll \frac{\mu x}{Y_{x/s}}, \frac{vx}{Y_{p/s}} = 0$

ดังนั้น สมการที่ 1, 2, 3 จะลดรูปเป็น

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \\ v &= \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \\ \frac{\mu}{Y_{x/s}} &= \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = v_s = \text{อัตราการใช้อาหารจำเพาะ (specific rate of substrate utilization)} \\ &\text{กรัมอาหาร/กรัมชีวมวล-ชั่วโมง}\end{aligned}$$

การหมักแบบต่อเนื่อง  $F \neq 0$

สมมติฐานเช่นเดียวกันกับการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง และที่สภาวะ steady state

$$\frac{dX}{dt} = 0, \quad \frac{dS}{dt} = 0, \quad \frac{dP}{dt} = 0$$

สมการที่ 1, 2, 3 ลดรูปเป็น

$$\mu = \frac{F}{V} = D = \text{dilution rate (ชั่วโมง)}^{-1}$$

$$v = \frac{F \cdot P}{V \cdot X} = \frac{DP}{X}$$

$$Y_{x/s} = X/(S_0 - S)$$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลอง

3.1 การแปรรูปแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยใช้วิธี Enzyme-enzyme hydrolysis

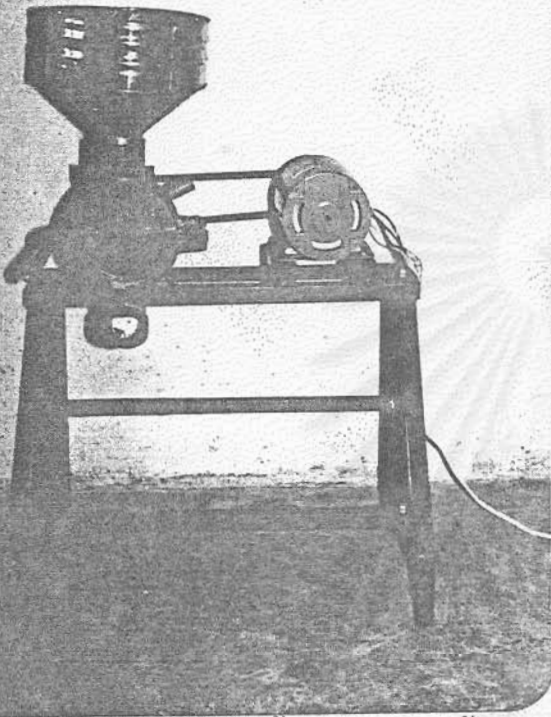
สามารถสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังต่อไปนี้

3.1.1 การเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง ให้มีความเข้มข้น 30% (w/w) ถ้าเป็นมันสด ให้นำหัวมันมาล้างน้ำแล้วปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำเข้าเครื่องบด (อาจจะบดมันสำปะหลังชนิดเปียกหรือแห้งก็ได้) (ดูรูปที่ 6, 7) คัดปริมาณแป้งในหัวมันสำปะหลังตามตารางดังต่อไปนี้

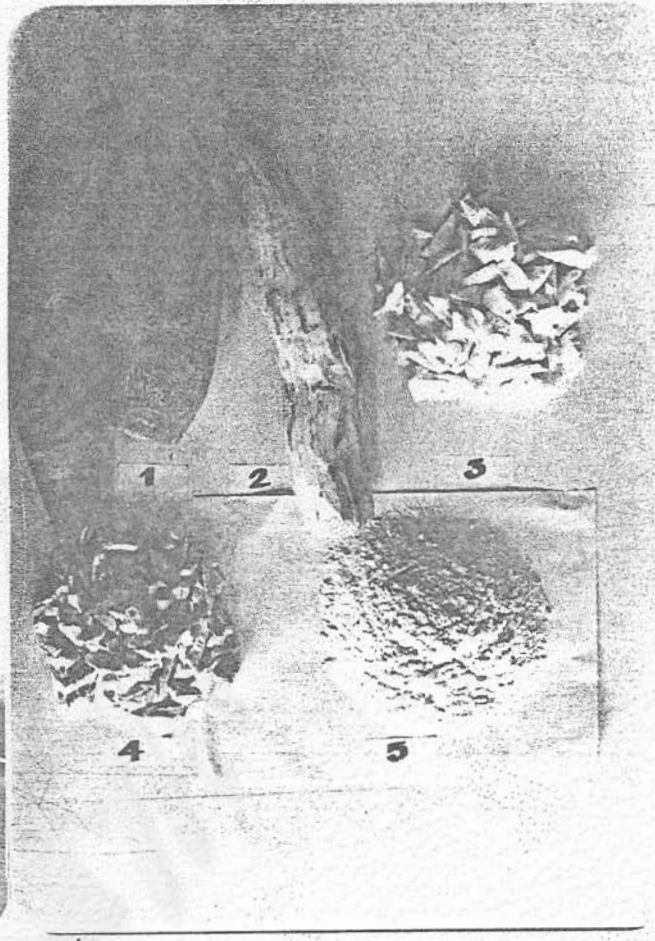
เดือน	กย.	ตค.	พย.	ธค.	มก.	กพ.	มีค.	เมย.	พค.
ปริมาณแป้ง (% โดยน้ำหนัก)	22	24	27	28	30	29	26	24	18

ข้อมูลปริมาณแป้ง นำมาจากโรงงานสหสินวัฒนา อ.โป่งน้ำร้อน จ. จันทบุรี ซึ่งใช้วิธีการวิเคราะห์แป้งโดยการแทนที่น้ำ (ดู Appendix 2)

หลังจากนั้นจึงเตรียมเป็นสารละลายแป้งมันสดให้มีความเข้มข้น ตามต้องการ (ดู Appendix 2)



รูปที่ 6 แสดงเครื่องบดชิ้นมันสำปะหลังให้เป็นผง



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการลดขนาดมันสำปะหลัง

1. มันสำปะหลัง
2. หัวมันสำปะหลังที่ปอกเปลือก
3. ชิ้นมันสำปะหลัง
4. มันสำปะหลังชนิดตากแห้ง
5. ผงมันสำปะหลัง

### 3.1.2 การแปรรูปแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

การแปรรูปแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.1.2.1 Liquefaction นำสารละลายแป้ง 30% (w/w) มาปรับ pH ด้วย NaOH 1 N ให้มี pH อยู่ระหว่าง 6 - 6.5 เติม  $\alpha$ -amylase enzyme จำนวน 0.1% ของน้ำหนักแป้ง กวนให้เข้ากัน (ดูรูปที่ 8) นำเข้าหมอนึ่ง (ดูรูปที่ 9) ที่ 120°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 60°C



รูปที่ 8 แอสตา - amylase enzyme, แป้งมันสำปะหลัง และสารละลาย  
ที่ผ่านการ Liquefaction แล้ว



รูปที่ 9 แอสตา-ออพนิ่งอัตโนมัติ

3.1.2.2 Saccharification นำสารละลายจากข้อ 3.1.2.1 มาปรับ pH ด้วย HCl ให้มี pH อยู่ระหว่าง 4.5-4.6 แล้วเติม amyloglucosidase enzyme จำนวน 1.5 ซม<sup>3</sup>/กิโลกรัมของแป้ง กวนให้เข้ากัน วางบนเครื่อง Magnetic stirrer with hot plate ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดูรูปที่ 10) และหยุด activity ของ enzyme ด้วยการต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ได้มาจากแป้งมันสำปะหลังจะเรียกว่า starch hydrolysate ถ้าเป็นมันสดจะเรียกว่า cassava hydrolysate

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้โดยใช้เครื่อง glucose analyser YSI model 27 (ดู Appendix 3) (ดูรูปที่ 11)

### สรุปสภาวะที่ใช้มีดังนี้

กระบวนการ	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Liquefaction	6 - 6.5	120	5 นาที
Saccharification	4.5 - 4.6	60	48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารละลายแป้ง : 30% (w/w)

α - amylase enzyme (Termamyl 120L) 0.1% ของน้ำหนักแป้ง

amyloglucosidase (AMG 300L) 1.5 ซม<sup>3</sup>/กิโลกรัมของแป้ง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3.2 กระบวนการหมักก๊าซโตน-บิวทานอล โดยการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการแปรรูปแป้ง

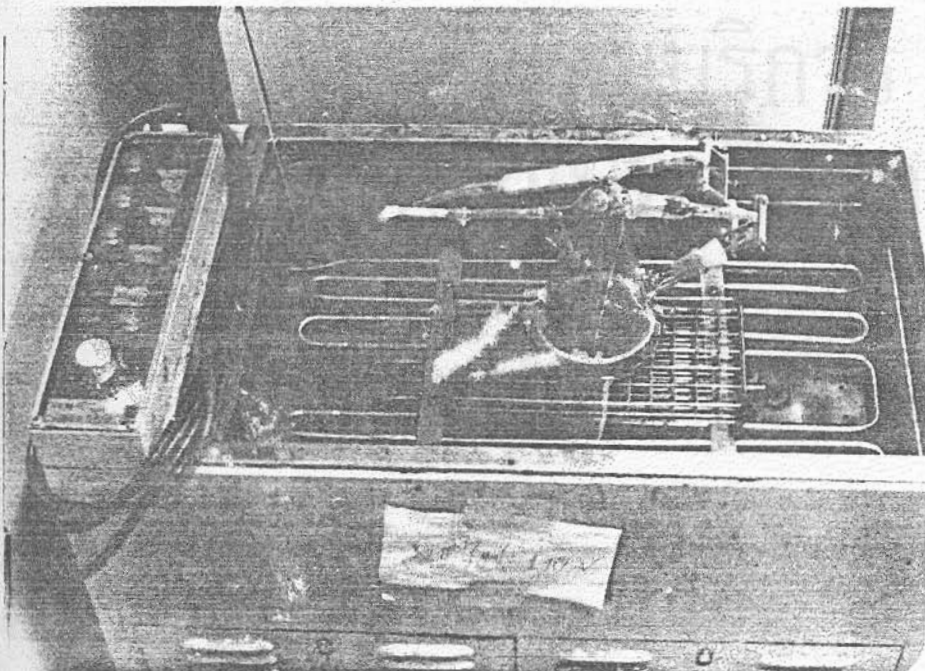
#### 3.2.1 จุลินทรีย์และสารอาหารที่ใช้ในการทดลอง

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Cl. butylicum* NRRL B592 ซึ่งเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง โดยใส่ไว้ใน culture tube เมื่อต้องการหมักจะนำ culture tube นี้มา propagate เพื่อ inoculate ลงในถังหมักต่อไป

สารอาหารและอาหารเสริมที่ใช้ได้แก่ (เป็นกรัม/ลิตร)  $K_2HPO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1,  $MnSO_4 \cdot 3H_2O$  0.01, NaCl 0.01, yeast extract 6 และน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการแปรรูปแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

#### 3.2.2 การเตรียม Inoculum

สารละลายอาหาร 200 มล. ถูกทำให้ปลอดเชื้อโดยใส่ลงในหม้อนึ่งที่สภาวะอุณหภูมิ  $120^\circ C$  เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง ผ่านก๊าซไนโตรเจนประมาณ 20 นาที เพื่อไล่ก๊าซออกซิเจนในสารละลายอาหาร เนื่องจาก *Cl. butylicum* เจริญได้ดีในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) แล้วใส่เชื้อ *Cl. butylicum* จาก culture tube จำนวน 15 มล. ลงในสารละลายอาหาร 200 มล. นี้ ผ่านก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งประมาณ 10 นาที นำ culture flask ไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ  $30^\circ C$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ดูรูปที่ 12) และ (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 แสดง culture flask ใน water bath ที่อุณหภูมิ  $30^\circ C$





รูปที่ 13 แสดงภาพ active inoculum

### 3.2.3 กระบวนการหมักแบคทีเรีย

#### 3.2.3.1 กระบวนการหมัก starch hydrolysate ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ

การทดสอบประกอบหน่วยขึ้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- เตรียม starch hydrolysate ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 30, 50, 80 กรัม/ลิตร โดยละลายในสารละลายอาหารเสริม
- เติมน้ำตาลอาหารจำนวน 10 มล. ลงใน culture tube ปิดจุก นำไปลวกที่ 120°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้ culture tube เย็นคว่ำมาเท่ากับชุดควบคุม
- ใส่ *C. butylicum* จำนวน 1.5 มล. ด้วย sterile pipette
- Incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 14)



- วิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายและกรดด้วย gas chromatography (ดู Appendix 4)
- เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสม



รูปที่ 14 แสดง culture tube ที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$

### 3.2.3.2 กระบวนการหมัก starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ

ผลจากการทดลองในข้อ 3.2.3.1 ทำให้ทราบช่วงอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสม ดังนั้นการทดลองในหัวข้อนี้ เราจะศึกษาผลของการหมักที่ pH 4.5, 5.5 และ 6.5 โดยคงสารที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3.1 ไว้

ขั้นตอนการทดลองมีดังต่อไปนี้

- เตรียมสารละลาย starch hydrolysate ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จำนวน 1.3 ลิตร เติลงในถังหมักที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและ pH ขนาด 2 ลิตร ทำให้ปอกห่อเชื้อในหม้อนึ่งที่  $120^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เชื้อตัวลงเห่าอุณหภูมิห้อง
- ผสานการในโพรเจกต์ของในสารละลายอาหารในถังหมักเป็นเวลา 20 นาที

- ปรับความเร็วรอบของ agitator ประมาณ 100 rpm ปรับ pH ที่ต้องการศึกษา ด้วย  $\text{NH}_4\text{OH}$  ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3.1
- เติ active inoculum จำนวน 200 มล. ลงในถังหมัก
- ผ่านก๊าซไนโตรเจนต่อไปอีก 10 นาที
- เริ่มเก็บตัวอย่างหลังจาก inoculation แล้ว และเก็บต่อ ๆ ไปทุก ๆ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 15)
- วิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายและกรดด้วย GC (FID)
- วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่เริ่มต้น และที่เหลือด้วย glucose analyser model 27
- วัดปริมาณก๊าซที่เวลาต่าง ๆ ด้วยระบบการแทนที่น้ำ
- วิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซด้วย GC (TCD)
- นับจำนวนแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์และ hemocytometer
- วัดปริมาณ  $\text{NH}_4\text{OH}$  ที่ถูกใช้ไปที่เวลาต่าง ๆ กัน (ดู Appendix 5)
- เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อหา pH ที่เหมาะสม



รูปที่ 15 แสดงภาพกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่องของ starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ

### 3.2.3.3 กระบวนการหมัก cassava hydrolysate และ dextrose

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสารอาหารและ pH แล้ว จึงได้ทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนสารอาหารไปเป็น Cassava hydrolysate และ dextrose ที่สภาวะเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 และข้อ 3.2.3.2

ขั้นตอนการทดลองเหมือนข้อ 3.2.3.2

(ดู Appendix 6)

### 3.2.4 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

ได้ทำการทดลองหมักแบบต่อเนื่องที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 และข้อ 3.2.

3.2 โดยใช้ starch hydrolysate เป็นสารอาหาร

ขั้นตอนการทดลองมีดังต่อไปนี้

- เริ่มต้นได้กระทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่องจำนวน 1 ลิตร (working volume) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิ, pH ความเร็วรอบของ agitator
- เปิดสวิตช์ feed pump ซึ่งทำหน้าที่ส่งสารอาหาร starch hydrolysate ที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 เข้าสู่อ่างหมัก ซึ่งควบคุมระดับไวกซ์ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยการดึงเอา fermentation broth ออกตลอดเวลา dilution rate ที่ใช้ในการทดลองคำนวณมาจากค่า specific growth rate เฉลี่ยที่ได้จากการหมักแบบไม่ต่อเนื่องที่สภาวะเดียวกัน
- เก็บตัวอย่างตามเวลาที่ระบุใน Appendix 7
- การวิเคราะห์เหมือนข้อ 3.2.3.2 ยกเว้นปริมาตรก๊าซวัดเป็นอัตราการเกิดก๊าซ

(ดูรูปที่ 16)



รูปที่ 16 แสดงภาพกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง starch hydrolysate

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการแปรรูปแป้งมันสำปะหลังและแป้งจากมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคส

ผลจากการทดลองแปรรูปแป้งมันสำปะหลังและแป้งจากมันสำปะหลังได้แสดงอยู่ในตารางที่ 5 จากการทดลองพบว่าแป้งมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์สูงกว่าแป้งจากมันสำปะหลัง ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเป็นเพราะมันสำปะหลังนำมาไฮโดรไลส์ได้ไม่ละเอียดมากพอ เอนไซม์ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของแป้งได้เต็มที่

#### 4.2 ผลการหมักน้ำตาลที่ได้จากการแปรรูปแป้ง

##### 4.2.1 ผลการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

##### 4.2.1.1 ผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลาย starch hydrolysate ต่อการหมัก

ผลการทดลองการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้ starch hydrolysate ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงอยู่ในรูปที่ 17

ผลจากการทดลองสรุปได้ดังนี้

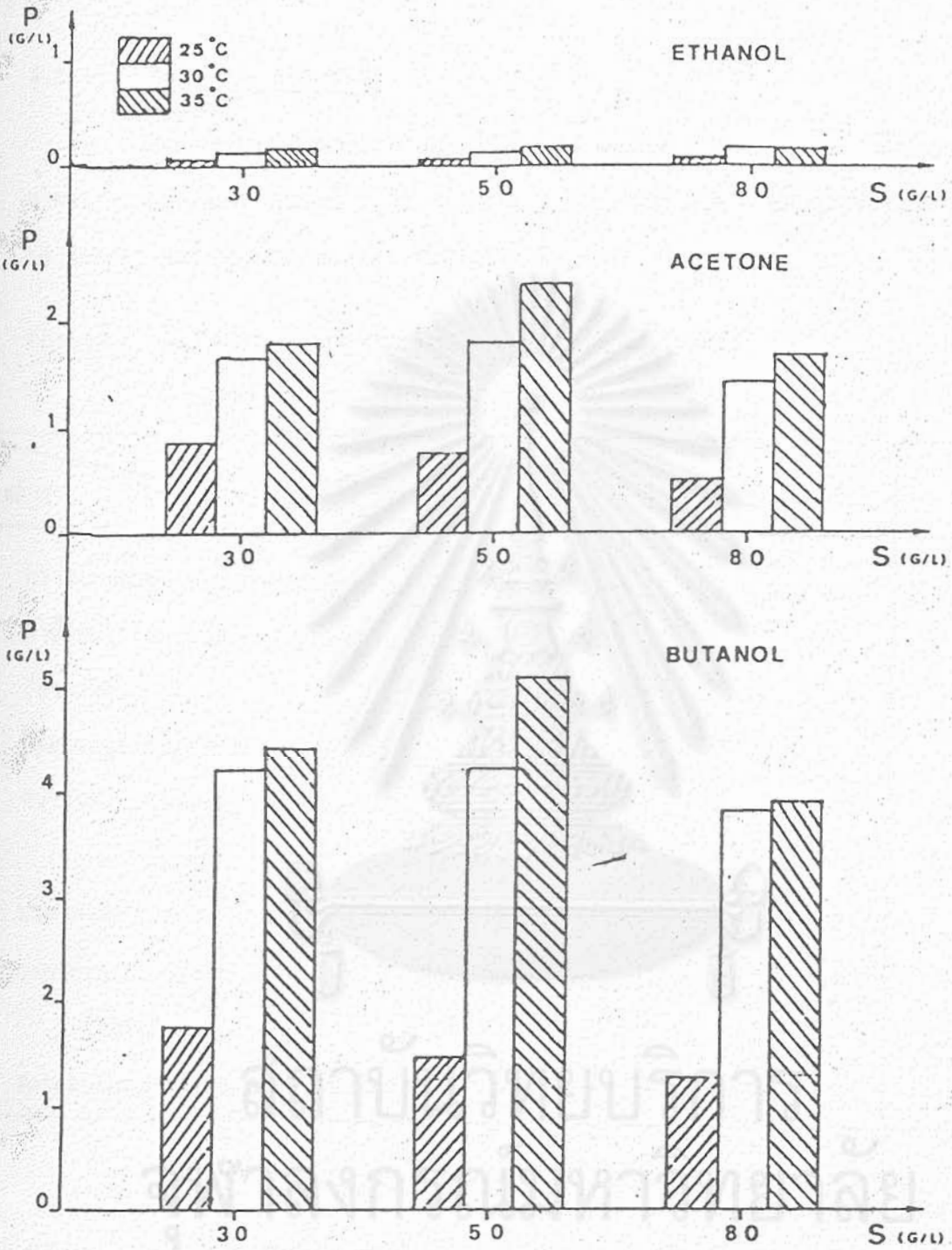
สภาวะที่เหมาะสม : ที่อุณหภูมิ 30 - 35°C  
: ความเข้มข้นของกลูโคสใน starch hydrolysate 50 กรัม/ลิตร

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้

: บิวทานอล	4.20 - 5.11	กรัม/ลิตร
: อีทานอล	1.80 - 2.37	"
: เอทานอล	0.12 - 0.19	"

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นของสารละลายแอม്മอนิแ่มน้ำส้มป่นและแอม്മอนิแ่มน้ำจืด, ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการทดลองและทฤษฎี, % ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส

รายการ	ความเข้มข้นของสารละลายแอม്മอนิแ่ม (กรัม/100 กรัมสารละลาย)		ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จากการทดลอง (กรัม/100 กรัมสารละลาย)		ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จากทฤษฎี (กรัม/100 กรัมสารละลาย)		% ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
แอม്മอนิแ่มน้ำส้มป่น	30	30	32	31.6	33.33	33.33	96.01	94.81	95.41
แอม്മอนิแ่มน้ำจืด	17.6	19.2	14.70	17.6	19.54	21.31	75.23	82.5	78.87



รูปที่ 17 แสดงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่หมักได้ (อาซีโตน-บิวทานอล-เอทานอล) ที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C และ 35°C และที่ความเข้มข้นของกลูโคส 30, 50 และ 80 กรัม/ลิตร



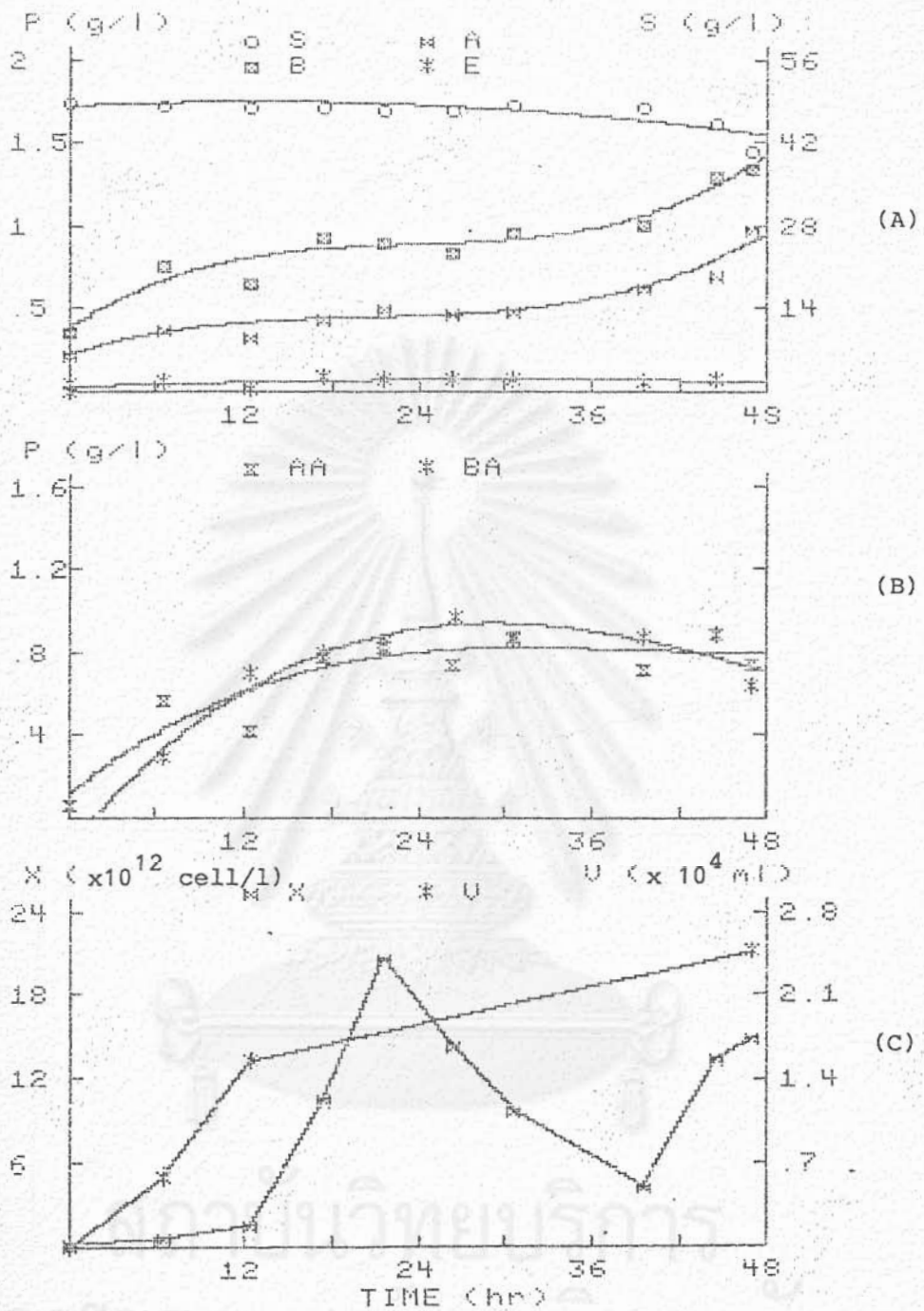
## 4.2.1.2 ผลของ pH ต่อการหมัก

ผลการทดลองการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้ starch hydrolysate ที่มีปริมาณน้ำตาล 50 กรัม/ลิตร อุณหภูมิ 30°C, ที่ pH 4.5, 5.5 และ 6.5 แสดงอยู่ในรูปที่ 18, 19 และ 20 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบผลจากการหมัก starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ

รายการ	pH	4.5	5.5	6.5
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล เอซีโตน, เอทานอล (กรัม/ลิตร) (ตามลำดับ)		0.99, 0.75, 0	9.38, 4.39, 0.26	8.47, 3.84, 0.25
2. ปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)		8.4	48	51.3
3. ความเข้มข้นสูงสุดของ Biomass (no of cell/l)		$2.06 \times 10^{13}$	$1.84 \times 10^{13}$	$6.9 \times 10^{12}$
4. ปริมาตรของก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ลิตร)		2.47	17.79	24.43
5. conversion yield (%) (กีดเฉพาะ solvent)		20.71	29.23	24.41
6. Total incubation time (ชั่วโมง)		47	60.5	61.5

จากตารางข้างต้น พบว่า ที่ pH 5.5 และ 6.5 ได้ผลผลิตของ solvent ใกล้เคียงกันคือ = 14.03 และ 12.56 กรัม/ลิตร และ % conversion yield = 29.23 และ 24.41 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า pH 5.5 และ 6.5 เป็นช่วงที่เหมาะสม ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงได้เปลี่ยนสารอาหารจาก Starch hydrolysate เป็น Cassava hydrolysate และ dextrose (pure glucose เป็นสารอาหารบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองอ้างอิง)



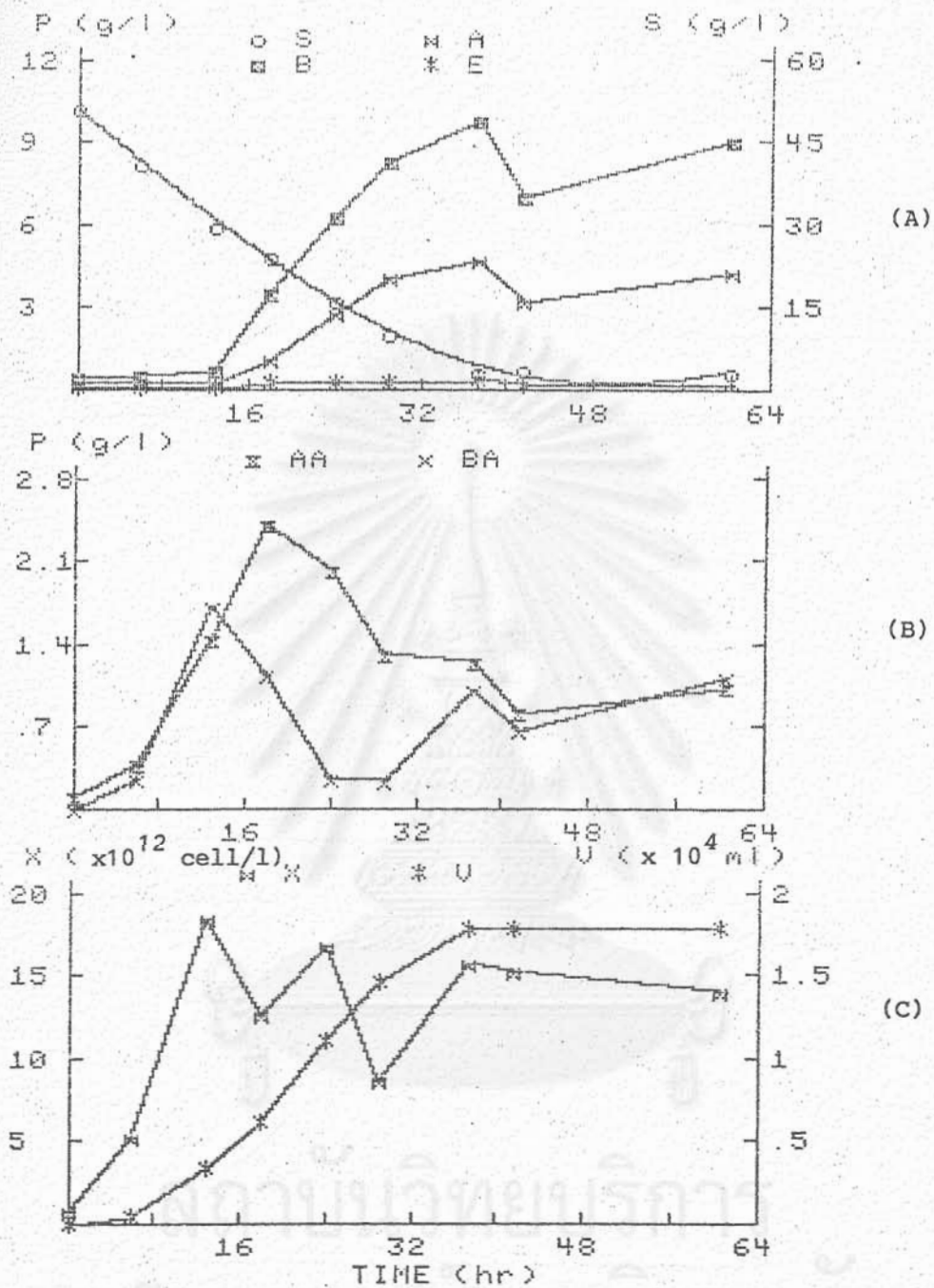
รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate

(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)  
และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (s)

(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (v), Biomass (x)

กับเวลา (time) ที่ pH 4.5



รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate

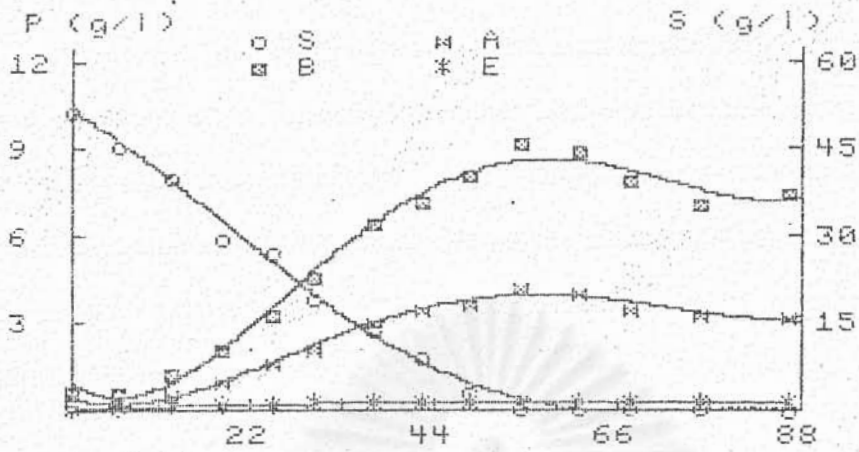
(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)

และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (S)

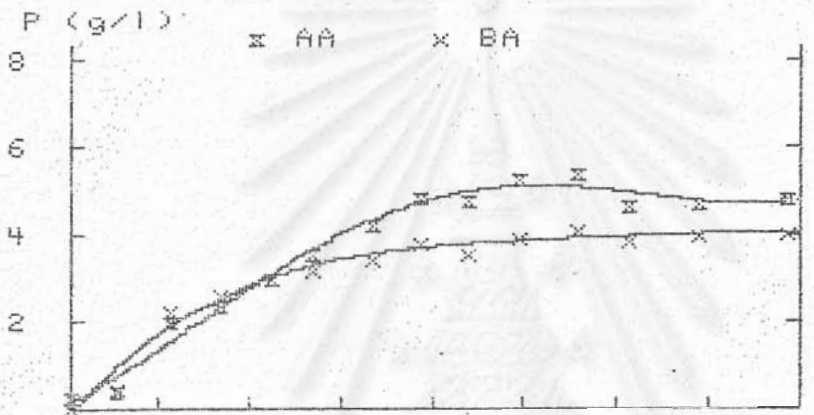
(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), Biomass (X)

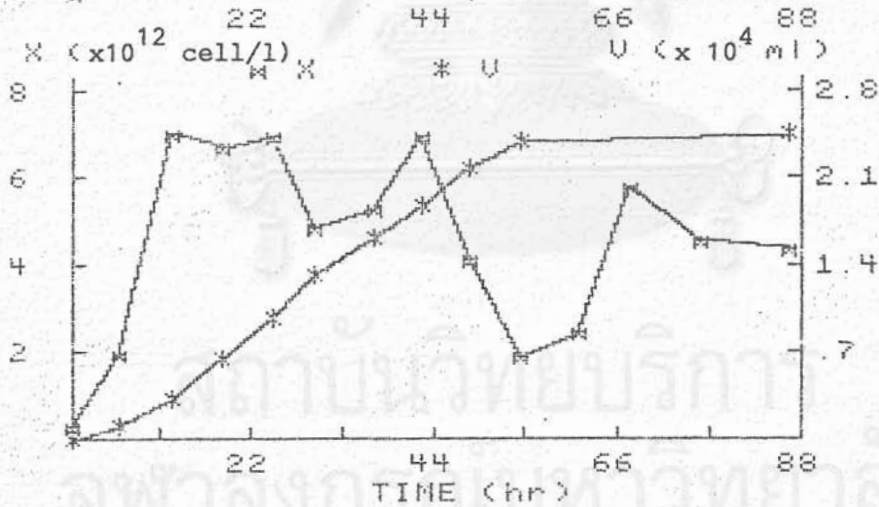
กับเวลา (time) ที่ pH 5.5



(A)



(B)



(C)

รูปที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate

(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)

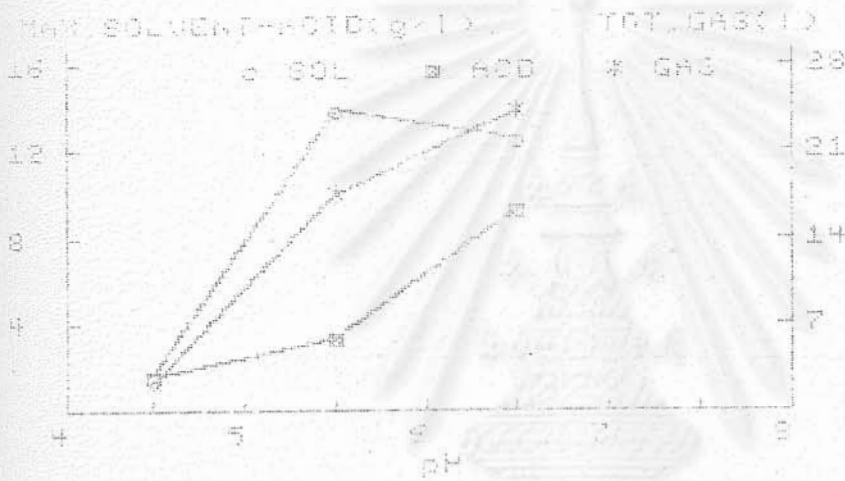
และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (S)

(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (U), Biomass (X)

กับเวลา (time) ที่ pH 6.5

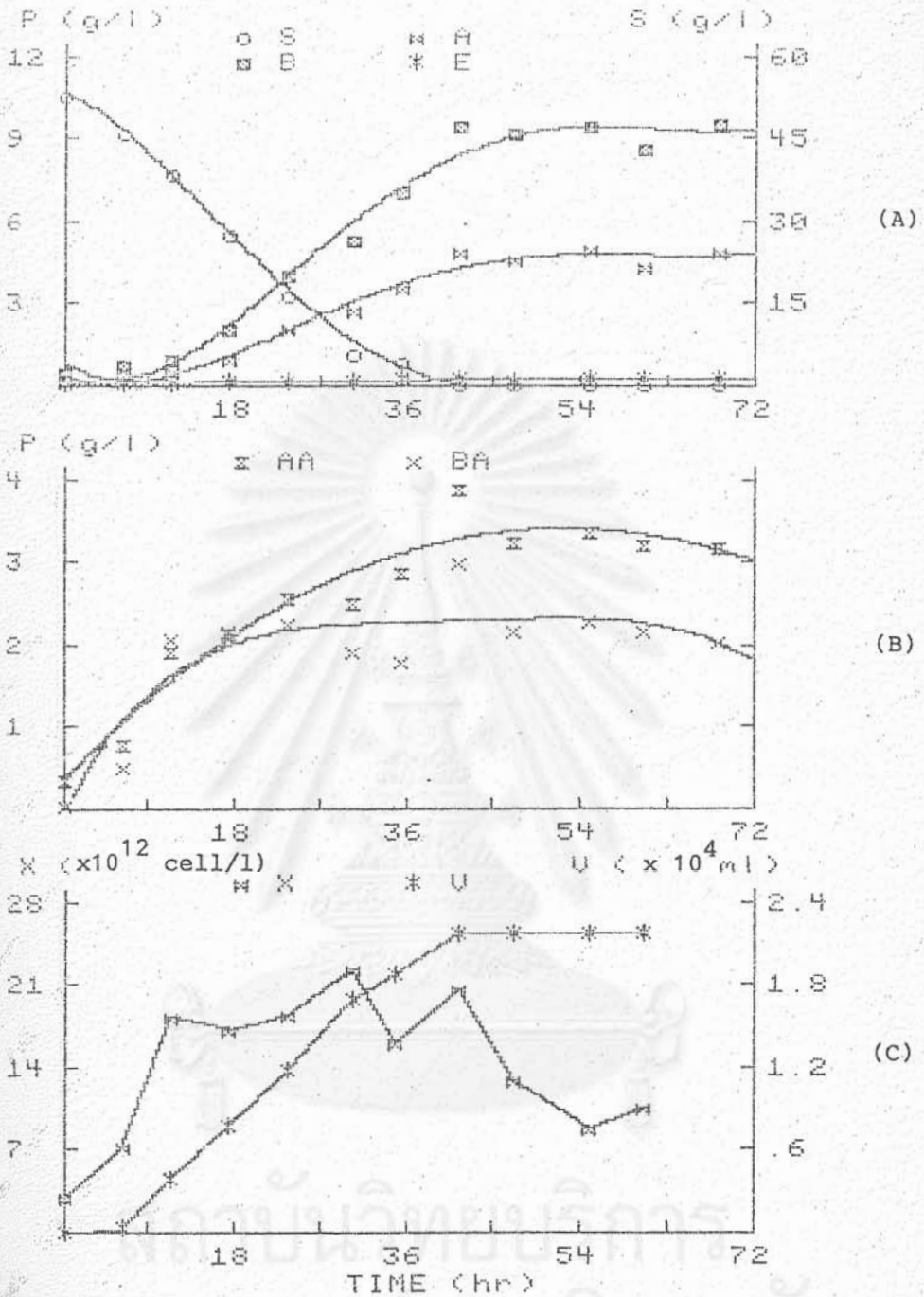
จากรูปที่ 21 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นรวมของกรดและปริมาตรรวมของก๊าซเพิ่มขึ้นตาม pH ก่อนข้างมาก ในขณะที่ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายที่ pH 6.5 ลดลงมาเล็กน้อย ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเกิดจากการที่ pH 6.5 นั้นเหมาะสมกับการสร้างชีวมวลที่สร้างกรด (เซลล์เป็นแบบแห้งสั้น) ชีวมวลเหล่านี้จะสร้างกรดอะซิติกและบิวทีริกพร้อม ๆ กับให้ก๊าซ  $H_2$ ,  $CO_2$  ออกมา (37) ปริมาณกรดจำนวนมากนี้อาจจะไปยับยั้งให้ Cl. butylicum สร้างตัวทำละลายน้อยลง



รูปที่ 21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นรวมของตัวทำละลาย, ความเข้มข้นรวมของกรด, ปริมาตรรวมของก๊าซที่ pH 4.5, 5.5 และ 6.5

#### 4.2.1.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนสารอาหาร

ผลจากการทดลองข้างต้นทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ  $30-35^{\circ}C$ , ความเข้มข้นของกลูโคส 50 กรัม/ลิตร และ pH ที่ 5.5 - 6.5) รูปที่ 22 และ 23 แสดงผลการหมักด้วย cassava hydrolysate และ dextrose ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตร อุณหภูมิ  $30^{\circ}C$  ที่ pH 6.5 และ 5.5 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 7



รูปที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก cassava hydrolysate

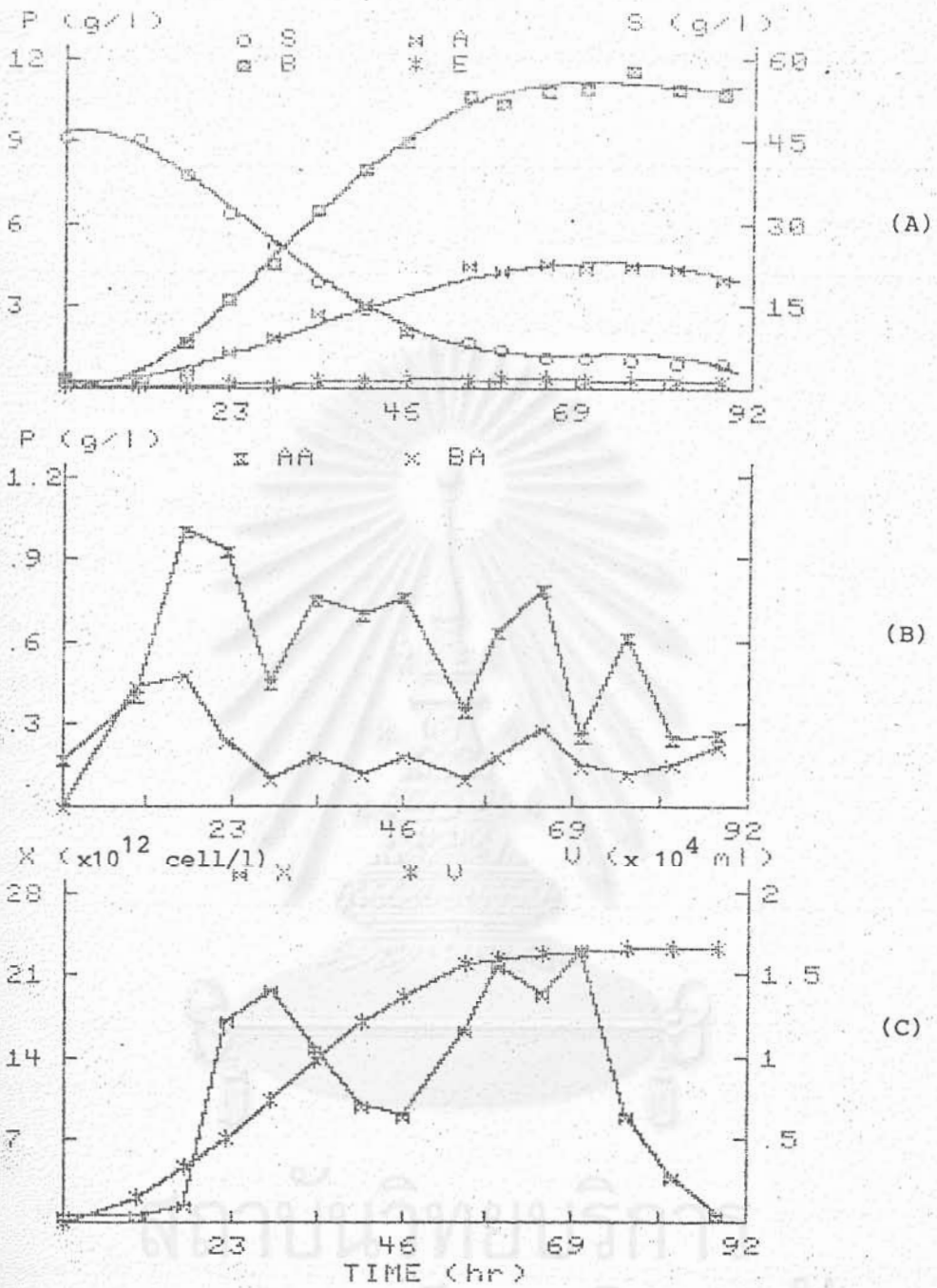
(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)

และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (S)

(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), Biomass (X)

กับเวลา (time) ที่ pH 6.5



รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก dextrose

(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)

และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (S)

(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), Biomass (X) กับเวลา (time) ที่ pH 5.5

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบผลจากการหมัก cassava hydrolysate และ dextrose

รายการ	สารอาหาร	cassava hydrolysate	dextrose
1. ความเข้มข้นสูงสุดของบิวทานอล, อาซีโตน, เอทานอล (กรัม/ลิตร) (ตามลำดับ)		9.51, 4.86, 0.27	11.58, 4.49, 0.34
2. ปริมาณกลูโคสที่ถูกใช้ไป (กรัม/ลิตร)		52.6	41.3
3. ความเข้มข้นสูงสุดของ Biomass (no of cell/l.)		$6.98 \times 10^{12}$	$2.29 \times 10^{13}$
4. ปริมาตรของก๊าซที่เกิดขึ้นทั้งหมด (ลิตร)		24.43	16.52
5. conversion yield (%) (คิดเฉพาะ solvent)		27.83	39.73
6. Total incubation time (ชั่วโมง)		68.5	88

จะเห็นว่า dextrose ซึ่งเป็นสารอาหารกลูโคสที่บริสุทธิ์ สามารถให้ % conversion yield ได้ถึง 39.73 ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายเท่ากับ 16.41 กรัม/ลิตร

เมื่อเปรียบเทียบผลการหมักโดยใช้ starch hydrolysate และ cassava hydrolysate ที่สภาวะเดียวกัน พบว่า cassava hydrolysate ให้ปริมาณตัวทำละลายมากกว่า starch hydrolysate นั่นคือ

- การหมักโดยใช้ starch hydrolysate ได้ตัวทำละลายรวม = 12.56 กรัม/ลิตร
  - การหมักโดยใช้ cassava hydrolysate ได้ตัวทำละลายรวม = 14.64 กรัม/ลิตร
- ซึ่งหมายความว่า มันสดเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมแก่การหมักมากกว่าแป้งมัน ที่เป็นเช่นนี้อาจ

เนื่องมาจากองค์ประกอบในวัตถุดิบเอง กล่าวคือ ในมันสดมีโปรตีน 0.71% และในแป้งมันสำปะหลัง มีโปรตีน 0.25% (38) และพบว่าปริมาณการใช้  $\text{NH}_4\text{OH}$  ในการหมัก starch hydrolysate มีค่าสูงกว่า พร้อมกันกับการเกิดกรดจำนวนมากกว่านั้น (ดู Appendix 5, 6) สนับสนุนงานวิจัยของ



#### 4.2.1.4 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และอัตราการสร้างผลึกน้ำจำเพาะ ( $\nu$ )

ผลการคำนวณค่า  $\mu$  และ  $\nu$  ของตัวทำละลายรวม ปรากฏอยู่ใน Appendix ที่ 8 และสรุปผลการคำนวณค่า  $\mu$  และ  $\nu$  สูงสุด ดังปรากฏในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตารางเปรียบเทียบค่า  $\mu$ ,  $\nu$  สูงสุดและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่สภาวะต่าง ๆ กัน

รายการ	$\mu$ สูงสุด (ช.ม.) <sup>-1</sup>	$\nu$ สูงสุด ( $\times 10^{-12}$ ) (กรัม/จำนวนเซลล์-ช.ม.)	ความเข้มข้น ของตัวทำละลาย (กรัม/ลิตร)
<u>การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง</u>			
Starch hydrolysate ที่ pH 4.5	0.298	0	1.74
ที่ pH 5.5	0.258	0.052	14.03
ที่ pH 6.5	0.247	0.090	12.56
cassava hydrolysate ที่ pH 6.5	0.174	0.032	14.64
Dextrose ที่ pH 5.5	0.312	0.316	16.41

พบว่าการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้ starch hydrolysate ที่ pH 4.5 มีค่า  $\nu$  ต่ำมาก ในขณะที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี (ค่า  $\mu$  สูง) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมัก *C. butylicum* เจริญเติบโตเพิ่มปริมาณชีวมวลในรูปของเซลล์สร้างกรด ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในสภาวะที่ pH 4.5 ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอีกต่อไป (ค่า  $\mu$  ลดลง) อัตราการสร้างตัวทำละลายจึงลดลงมาก (ดู Appendix ที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบ starch และ cassava hydrolysate ที่ pH 6.5 พบว่า อัตราการเจริญเติบโตมีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่อัตราการสร้างเซลล์จากน้ำตาลในมันส์ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะ *C. butylicum* มีอัตราการสร้างเซลล์อย่างช้า ๆ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ที่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายและกรดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และพบว่าการหมักน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ ให้ค่า  $\mu$  และ  $\nu$  สูงที่สุด เนื่องจากเป็นสารบริสุทธิ์

#### 4.2.1.5 องค์ประกอบของก๊าซ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซตามเวลาของแต่ละการทดลอง ปรากฏอยู่ใน Appendix ที่ 5, 6 และสรุปผลการทดลองดังที่ปรากฏอยู่ในตารางที่ 9

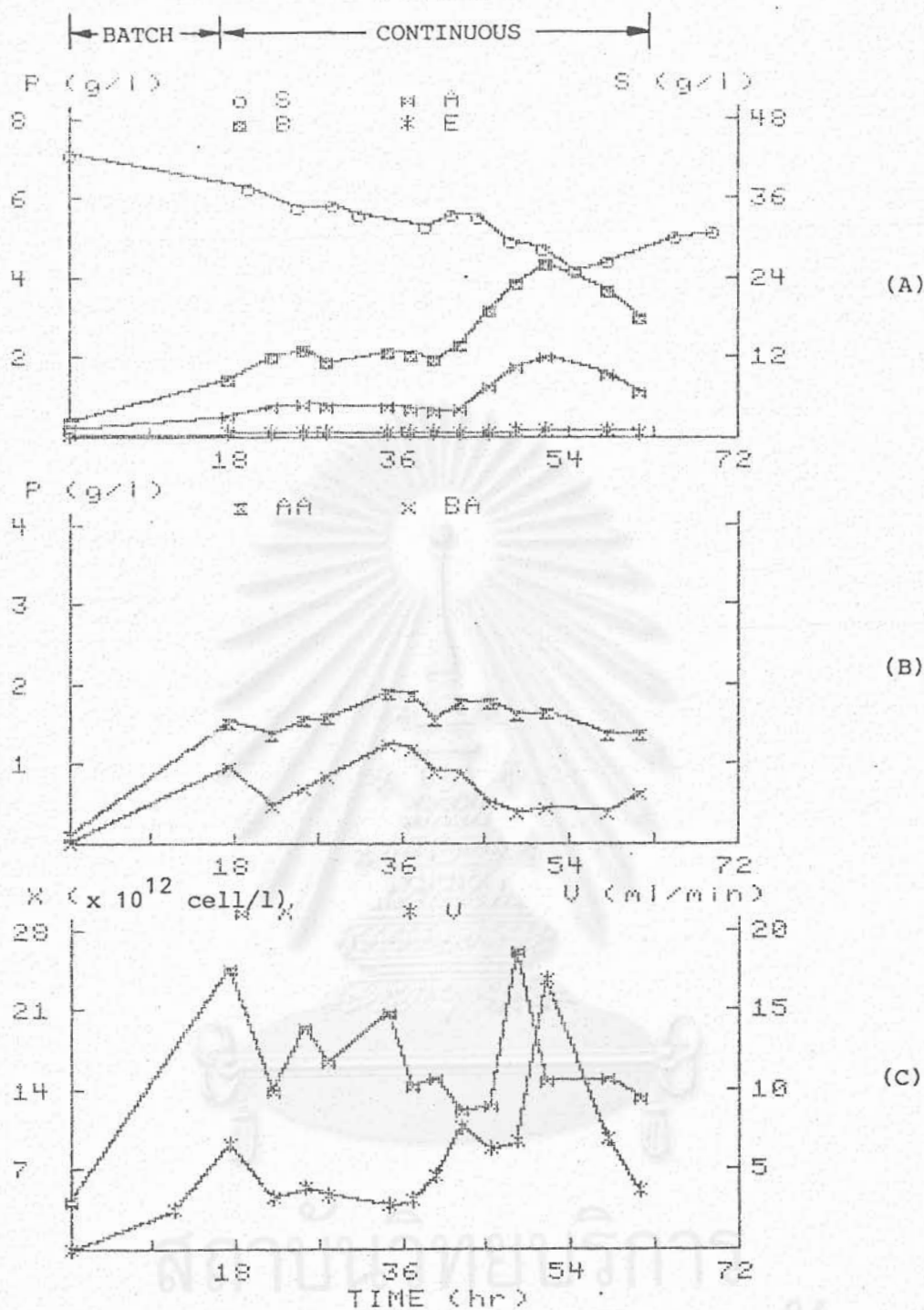
ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบ % องค์ประกอบของก๊าซที่สภาวะต่าง ๆ กัน

รายการ	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรรวมสูงสุดของ ก๊าซตามช่วงเวลา (ลิตร)	องค์ประกอบ (% โดย ปริมาตร)		
			H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	
starch hydrolysate	ที่ pH 4.5	13.3	0.94		
	ที่ pH 5.5	25	4.85		
	ที่ pH 6.5	31	3.40		
cassava hydrolysate	ที่ pH 6.5	31.7	5.26		
dextrose	ที่ pH 5.5	55	1.90		
				H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
				76.96	23.04
				39.13	60.87
				50.40	49.60
				42.77	57.23
				39.78	60.22

#### 4.2.2 ผลการหมักแบบต่อเนื่อง

ผลจากการคำนวณค่า  $\mu$  เฉลี่ยตามเวลาพบว่ามีความประมาณ  $0.15 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$  ดังนั้นในการหมักแบบต่อเนื่องจะควบคุม dilution rate ( $\frac{F}{V}$ ) ที่  $0.15 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$  สภาวะการหมักแบบต่อเนื่องที่ใช้มีดังนี้ อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$ , pH 6.5, ความเร็วรอบของ agitator 100 rpm ความเข้มข้นของ Starch hydrolysate = 50 กรัม/ลิตร ผลการทดลองปรากฏอยู่ในรูปที่ 24 และสรุปผลการทดลองไว้ในตารางที่ 10

$$D = 0.15 \text{ hr}^{-1}$$



รูปที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate แบบต่อเนื่อง

(A) Butanol (B), Acetone (A), Ethanol (E)

และปริมาณกลูโคสที่เหลือ (S)

(B) Acetic acid (AA), Butyric acid (BA)

(C) อัตราการเกิดก๊าซ ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ) (V), Biomass (X)

กับเวลา (time)

ตารางที่ 10 แสดงผลสรุปของการหมักแบบต่อเนื่อง

solvent productivity ที่ $D = 0.15$ ชั่วโมง <sup>-1</sup>	=	0.44	กรัม/ลิตร-ชั่วโมง
ความเข้มข้นเฉลี่ยของบิวทานอล	=	2.06	กรัม/ลิตร
อะซีโตน	=	0.75	กรัม/ลิตร
เอทานอล	=	0.09	กรัม/ลิตร
$\mu$ สูงสุด, $\mu$ เฉลี่ย	=	0.233	ชั่วโมง <sup>-1</sup> , 0.15 ชม. <sup>-1</sup>
$v$ ของตัวทำละลายสูงสุด	=	$0.037 \times 10^{-12}$	กรัม/จำนวนเซลล์-ชม.

จะเห็นว่า solvent productivity ของการหมักแบบต่อเนื่องสูงกว่าประมาณ 2.2 เท่าของการหมักแบบไม่ต่อเนื่องที่สภาวะเดียวกัน (batch solvent productivity = 0.20 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง เมื่อคิดเทียบกับเวลาที่ใช้ในการหมักเท่านั้น)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัยและขอเสนอแนะ

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตบิวทานอล-อาซีโตน-เอทานอล (ตัวทำละลาย) จากการหมักโดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ในขั้นแรกศึกษาผลของการหมักแบบไม่ต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25, 30, 35°C และใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการแปรรูปแป้ง (starch hydrolysate) ที่ความเข้มข้น 30, 50, 80 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมของการหมักจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30-35°C ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตร ได้ตัวทำละลายรวมประมาณ 6.12-7.67 กรัม/ลิตร เนื่องจาก pH เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการหมักเป็นอย่างมาก ดังนั้น ในขั้นต่อไปจึงได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการหมัก ค่าที่ทำการทดลองคือ 4.5, 5.5 และ 6.5 โดยใช้ starch hydrolysate ที่ความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร พบว่าที่ pH 5.5 และ 6.5 ให้ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลายใกล้เคียงกันคือ 14.03 และ 12.56 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงสามารถสรุปผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก starch hydrolysate ได้คือ อุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 30-35°C, pH ที่ 5.5-6.5 ในการใช้น้ำตาลกลูโคสจากหัวมันสด (cassava hydrolysate) เพื่อทำการหมักที่สภาวะเช่นเดียวกันนี้พบว่าได้ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลาย 14.64 กรัม/ลิตร  $\mu$  สูงสุด 0.174 ชม.<sup>-1</sup> v สูงสุด  $0.032 \times 10^{-12}$  กรัม/จำนวนเซลล์-ชั่วโมง และเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ได้ตัวทำละลายทั้งหมด 16.41 กรัม/ลิตร

การทดลองขั้นท้ายสุดได้ศึกษาผลของการหมักแบบต่อเนื่อง โดยอาศัยข้อมูลจากการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเมื่อทำการหมัก starch hydrolysate 50 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 30°C, dilution rate 0.15 ชม.<sup>-1</sup> pH 6.5 จะได้ความเข้มข้นรวมของตัวทำละลาย 2.9 กรัม/ลิตร ด้วยอัตราการผลิต 0.44 กรัม/ลิตร-ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง = 2.2 เท่า

ขอเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไปมีดังนี้

1. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้วัสดุทางการเกษตรอื่น ๆ ที่มีราคาถูก หาง่าย เพื่อนำมาใช้ผลิตตัวทำละลายโดยกระบวนการหมัก เช่น กากน้ำตาล, ช่างข้าวโพด, ฟางข้าว ฯลฯ
2. ศึกษาการเพิ่มอัตราผลผลิตโดยอาศัยกระบวนการหมักที่ประยุกต์ใช้กับระบบการแยกจุลินทรีย์เพื่อนำกลับมาใช้งานได้อีก หรือประยุกต์ใช้กับระบบการแยกผลิตภัณฑ์เพื่อลดสภาวะยับยั้งการผลิต (inhibition) เช่น ultrafiltration system, reverse osmosis system ฯลฯ



เอกสารอ้างอิง (Reference)

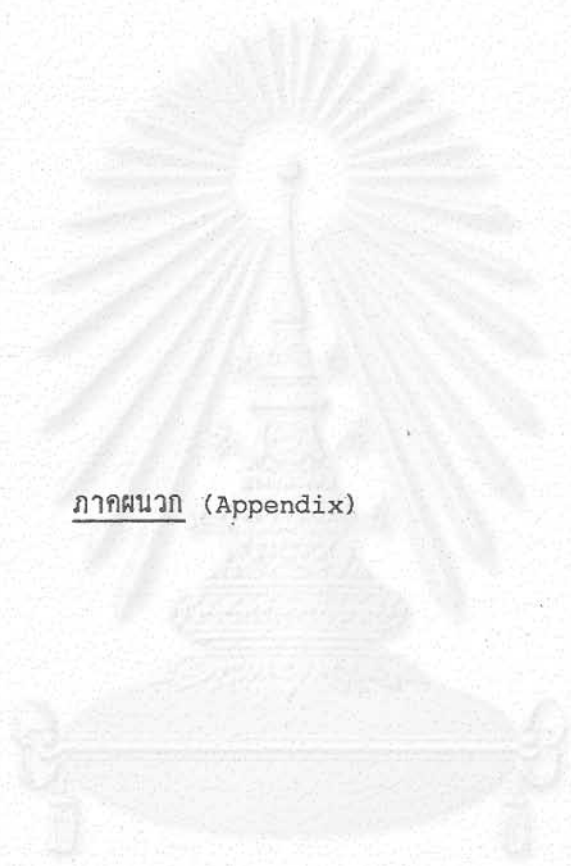
1. McKETTA J.J., (1977), Encyclopedia of chemical processing and design., Vol. 5. Marcel Dekker, Inc., New York.
2. KINGMA W.G. (1969). Crystalline dextrose manufacture. Proc. Biochem., July, 19-21.
3. เขียว คาวตัก (1981). เทคโนโลยีการผลิตน้ำตาลฟรุคโตสจากแป้ง. วารสารเคมีวิศวกรรม เทคโนโลยีทางอาหารและเชื้อเพลิง ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 หน้า 113-125.
4. เอกสารเรื่อง Novo Enzymes จากบริษัทออสต์เอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด.
5. BEESCH S.C., (1985). Acetone-butanol fermentation of sugars. Ind. Eng. Chem., 44, 1677-1682.
6. โกวิท ศตวุฒิ และ อธิพิล ปานงาม (1984) การวิจัยเพื่อนำแอลกอฮอล์หนักมาใช้เป็นเชื้อเพลิงกับเครื่องยนต์สันดาปภายใน, หุ้ส่งเสริมการวิจัยด้วยเงินงบประมาณแผ่นดิน.
7. เบลูจ ภมรสุค และพวก (1985). โครงการวิจัยเติมสารเสริมในแอลกอฮอล์เพื่อใช้แทนน้ำมันดีเซล. สภาวิจัยแห่งชาติ.
8. BRECHOT P., (1982). Fermentation acétono-butylique depuis Pasteur, Fernbach et ses collaborateurs Colloque Société France Microbiol., IFP, Rueil-Malmaison, 111-122.
9. PIMPA P., MUANGNAPOH C., MINIER M., GOMA G., (1982) Fermentation acetonobutylique : Observations sur les mecanismes d' inhibition, Colloque Société France Microbiol., IFP, Rueil-Malmaison, 297-315
10. ROBSON P.M., JONES D.T., (1982) Industrial production of acetone-butanol. Colloque Société France Microbiol., IFP, Rueil-Malmaison 169-213.
11. VANDECASTEELE J.P., MARCHAL R., HERMANN M., FAYOLLE F., BLANCHET D., (1982) Production de carburants par fermentation acétonobutylique. Colloque Société France Microbiol., IFP, Rueil-Malmaison, 215-234

12. SADDLER J.N., YU E.K.C., MES-HARTREE M., LEVITIN N., BROWNELL H.N., (1983). Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by micro-organisms for production of liquid fuels. *App. Environ. Microbiol.*, 45, 153-160.
13. WALTON M.T., MARTIN J.L., (1979). Production of butanol-acetone by fermentation. In "Microbial Technology" 2nd. ed., vol. 1, 187-209. Academic Press, New York.
14. ROSS D., (1961). The acetone-butanol fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.*, 3, 71-90.
15. RYDEN R., (1958). *Biochem. Eng.* (Ed. Steel R.) (Heywood, London)
16. GOTTSCHAL J.C., MORRIS J.C., (1981). Non production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum during glucose and ammonium limitation in continuous culture. *Biotechnol. Lett.*, 3, 523-530.
17. ROBSON P.M., JONES D.T., (1982). Industrial production of acetone-butanol. *Colloque Société France Microbiol.*, IFP, Rueil - Malmaison, 169-213.
18. GEORGE H.A., CHEN J.S., (1983). Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by Clostridium beijerinckii (Syn. Cl. butylicum). *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 321-327.
19. WEBSTER J.R., REID S.J., JONES D.T., WOOD D.R., (1981). Purification and characterization of an autolysin from Cl. acetobutylicum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 371-374.
20. BAHL H., ANDERSCH W., GOTTSCHALK G., (1982). Continuous production of acetone and butanol by Clostridium acetobutylicum in a two-stage phosphate limited chemostat. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 201-205.

21. PRESCOTT S.C., DUNN C.G., (1959). In "Industrial microbiology" 3 rd. ed., 250-284 New York, McGraw-Hill Book Company, Inc.
22. MONOT F., MARTIN J.R., PETITDEMANGE H., GAY R., (1982). Acetone and butanol production by Cl. acetobutylicum in a synthetic medium. Appl. Environ. Microbiol., 44, 1318-1324.
23. BAHL H., ANDERSCH W., BRAUN K. and GOTTSCHALK G., (1982). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by Cl. acetobutylicum grown in continuous culture. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 17-20.
24. BAHL H., GOTTSCHALK G., (1984). Parameters affecting solvent production by Cl. acetobutylicum in continuous culture. Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 215-224.
25. GOTTSCHALK G., BAHL H., (1981). Feasible improvements of the butanol production by Cl. acetobutylicum In : Hollander A.(ed) Trends in the biology of fermentation for fuels and chemicals. Plenum Press, New York, 463-471.
26. HUANG L., GIBBINS L.N., and FORBERG., (1985). Transmembrane pH gradient and membrane potential in Cl. acetobutylicum during growth under acetogenic and solventogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol, vol. 50, No 4., 1043-1047.
27. VOGET C.E., MIGNONE C.F., and ERTOLA R.J. (1985). Influence of temperature on solvents production from whey. Biotechnol Lett., vol 7, No 8, 607-610.
28. McMEIL B., and KRISTIAKSEN B., (1985). Effect of temperature upon growth rate and solvent production in batch culture of Cl. acetobutylicum. Biotechnol Lett., vol 7, No 7, 499-502.
29. YERUSHALMI L., and VOLESKY B., (1985). Importance of agitation in acetone-butanol fermentation. Biotechnol/Bioeng., vol. 27, 1297-1325.



30. KLEI H.E., SUNDSTROM D.W., and MILLER J.E., (1984). Fermentation by Cl. acetobutylicum under carbondioxide pressure. Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 353-364.
31. MUANGNAPOH C., (1984). Fermentation acétonobutylique par Cl. butylicum NRRL B592: Optimisation de la mise en oeuvre en culture continuous. Thèse docteur ingénieur, INSA TOULOUSE.
32. HÄGGSTROM L., MOLIN N., (1980). Calcium alginate immobilized cells of Cl. acetobutylicum for solvent production. *Biotechnol. Lett.*, 2, 241-246.
33. MINIER M., FERRAS E., GOMA G., SOUCALLCE P., (1984). Improvement of microbial production based on physiological and technical approach. VII the International Biotechnology Symposium, New Delhi, February 19-25.
34. GARCIA III A., IANNOTTI E.L. and FISCHER J.R., (1984). Reverse osmosis application for butanol-acetone fermentation. Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. 543-552.
35. POMERANZ Y., and MELOAN E.C., (1980). Food analysis theory and practice. 2nd ed., Connecticut: Avi. Publishing Company Inc.,
36. JONES D.T., VAN DER WESTHUIZEN A., LONG S., ALLCOCK E.R., REID S.J., WOODS D.R., (1982). Solvent production and morphological changes in Cl. acetobutylicum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1434-1439.
37. VOLESKY B., SZCZESNY T., (1983). Bacterial conversion of pentose sugars to acetone and butanol. *Adv. in Biochem. Eng./Biotech.*, 27., 101-118.
38. นฤมล ศรีสุมะ, สุนันทา วงศ์ปิยชน, ชัยยุทธ ธัญพิทยากุล, (1981). การผลิตแอลกอฮอล์จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง. วารสารเคมีวิศวกรรม เทคโนโลยีทางอาหารและเชื้อเพลิง ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 หน้า 11-23.



ภาคผนวก (Appendix)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Appendix 1

NOVO ENZYME

$\alpha$  - amylase ของบริษัท NOVO Enzyme มีชื่อทางการค้าว่า Termamyl และ BAN (Bacterial Amylase NOVO)

Termamyl เป็นเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 105°C ใช้ไฮโดรไลส์ 1, 4 -alpha-glycosidic linkage ทั้งใน amylose และ amylopectin มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลดำ แยกออกเป็น 2 ชนิดคือ Termamyl 60L และ Termamyl 120L (60, 120 แสดง activity ของเอนไซม์ซึ่งมีหน่วยเป็น KNU.)

งานวิจัยนี้ใช้ Termamyl 120L

คุณสมบัติของ Termamyl 120L มีดังนี้

ความหนาแน่น 1.2 กรัม/มล.

pH ในการใช้งาน 6-8

activity 120 KNU/g

ละลายน้ำได้ดีทุก ๆ ความเข้มข้น

1KNU (kilo NOVO-alpha-amylase unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ 5.26

กรัมต่อชั่วโมง ตามวิธีการของ NOVO ซึ่ง activity ของ Termamyl นี้หาได้จาก Standard condition ที่กำหนดขึ้นจากบริษัท NOVO enzyme ดังนี้

Substrate	soluble starch
Calcium content in solvent	0.0043
Reaction time	7.2
Temperature	37°C
pH	5.6

Termamyl สามารถใช้งานได้ดีในอุตสาหกรรมแป้ง, แอลกอฮอล์ กระดาษและเครื่องคั้น ข้อดีมาก  
ของ Termamyl คือทนอุณหภูมิได้สูง ใช้ได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง ปริมาณการใช้งานประมาณ  
0.4-0.8 กก/ตันของแป้ง

Amyloglucosidase (AMG) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดลิต์ที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตได้จากราดำ (Aspergillus  
niger) มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ใช้ในการไฮโดรไลส 1, 4 และ 1, 6-alpha - glycosi-  
dic linkage ของพวก malta-dextrin และ Oligosaccharide อัตราการไฮโดรไลส  
1, 6 - alpha-glycosidic linkage จะช้ากว่าการไฮโดรไลส 1,4-alpha-glycosidic  
linkage AMG ของ NOVO Enzymes มีหลายชนิดคือ AMG 300L AMG 200L, AMG 150L  
ที่ใช้ในงานวิจัยคือ AMG 300L

คุณสมบัติของ AMG 300L มีดังนี้

ความหนาแน่นประมาณ 1.2 กรัม/มล.

pH ในการใช้งาน 3-5

activity 300 AGU/ml

ละลายน้ำได้ดีทุก ๆ ความเข้มข้น

1 AGU (Amyloglucosidase unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่ไฮโดลิต์แยก 1 micromole  
ของ maltose ต่อ นาที ตามวิธีการของ NOVO ซึ่ง activity นี้หาได้จาก standard condition  
ที่กำหนดขึ้นจากบริษัท NOVO Enzyme ดังนี้

Substrate maltose 10 g/l

Reaction time

maltose + enzyme 30 min

glucose dehydrogenase 20 min

Total 50 min

Temperature 25°C

pH 4.3

AMG 300L ที่ใช้ในอุตสาหกรรมแป้ง นิยมปฏิบัติที่อุณหภูมิ  $60^{\circ}\text{C}$  pH 4.5 เป็น  
 เวลา 48-96 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณ AMG ประมาณ 1-1.2 ลิตรต่อตันของน้ำหนักรีดแห้ง  
 ความเข้มข้นของสารละลายแป้งประมาณ 30-35% (โดยน้ำหนักรีดแห้ง)



สถาบันวิทยบริการ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# Novo Enzymes



## Termamyl<sup>®</sup>

### Description

Termamyl is a liquid enzyme preparation containing an outstandingly heat-stable alpha-amylase produced by a selected strain of *Bacillus licheniformis*. The enzyme is an endo-amylase which will hydrolyze 1,4-alpha-glucosidic linkages in amylose and amylopectin. Starch is therefore rapidly broken down to soluble dextrins and oligosaccharides.

### Product Types

Termamyl is available in the following types:

- Termamyl 120 L
- Termamyl 120 L, type Lo-prot
- Termamyl 60 L
- Termamyl 60 L, type Tech

Products are dark brown liquids with a density of approximately 1.2 g/ml and a pH in the range of 6-8.

Termamyl 120 L and Termamyl 60 L are standard, food grade products; Termamyl 120 L, type Lo-prot is also a food grade product, but with an especially low proteolytic side activity. Termamyl 60 L, type Tech is a technical grade product.

### Product Specification

Termamyl 120 L (all types)	120 KNU/g
Termamyl 60 L (all types)	60 KNU/g

### Characteristics

Food grade products comply with FAO/WHO JECFA and recommended specifications for food grade enzymes, determined with maximum limits of  $5 \times 10^4$ /g for total viable count and  $10^3$ /g for moulds.

### Activity Determination

One Novo alpha-amylase Unit (1 KNU) is the amount of enzyme which breaks down 5.26 g starch (Merck, Amylum Sorghum B. 6, Batch 9947275) per hour at Novo's standard conditions for determination of alpha-amylase based upon the following standard conditions:

Substrate	soluble starch
Calcium content of solvent	0.0043 M
Reaction time	7-20 min.
Temperature	37°C
pH	5.6

For a full description of Novo's analytical method (AF 9) is available on request.

### Applications

Termamyl is used in the following industries:

- Starch
- Alcohol
- Brewing
- Sugar
- Textile

In the starch industry, Termamyl is used for continuous liquefaction of starch in steam jet cookers or similar equipment operating at temperatures up to 105-110°C and thereby taking advantage of the extreme heat stability of this enzyme.

In the alcohol industry, Termamyl is used for thinning of starch in distilling mashes. Also here advantage is taken of the heat stability of the enzyme. Furthermore it is quite possible to work without pH adjustment and Ca-addition even if conditions are somewhat removed from the optimum conditions. This is due to the relatively broad pH-tolerance and low Ca-requirements of the enzyme. This simplifies the process and minimizes risk of Ca-scaling in the distillation column.

In the brewing industry, Termamyl is used for adjunct liquefaction. Due to the extreme heat stability of the enzyme, the cooking programme can be simplified; also an increase in proportion of adjuncts is made possible.

In the sugar industry, Termamyl is used to break down the starch present in cane juice. Thereby the starch content in the raw sugar is reduced and filtration at the refinery facilitated.

In the textile industry, Termamyl is used for high-speed, high-temperature desizing of textiles prior to dyeing. The technical grade of the enzyme is used for this application.

Our more detailed recommendations with respect to operating conditions are given in separate papers for each industry and are available on request.

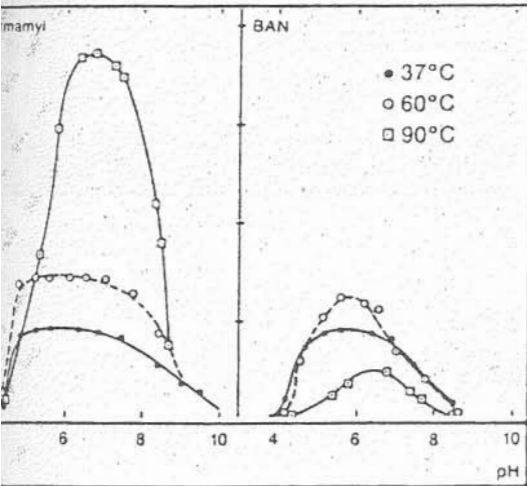
### Solubility

The active enzyme components of Termamyl are readily soluble in water at all concentrations which occur in normal usage. Turbidity which may occur in the enzyme preparation has no influence on the volumetric activity or handling characteristics of the product.

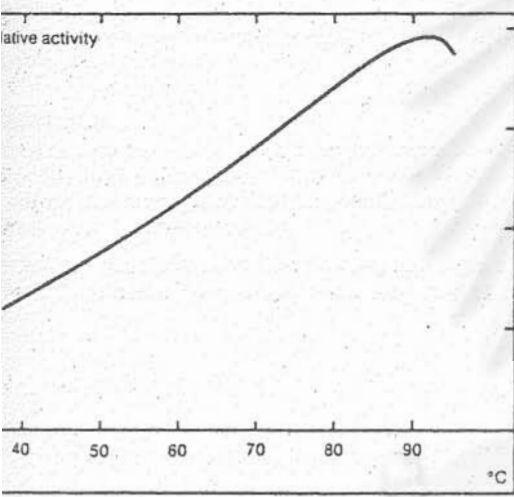
### Handling Precautions

The product is non-flammable and completely miscible with water. Unnecessary contact with the product or inhalation of dust from the dried product should be avoided. In case of spillage or accidental contact with skin or eyes, rinse by flushing with water.

A separate Novo Leaflet, "How to handle liquid Novo enzymes - safely" is available on request.



Graph showing the activity of Termamyl (Y-axis) versus pH (X-axis) for conventional alpha-amylase BAN shown for 0.5% soluble starch 30-60 ppm calcium



Graph showing the temperature on the activity of Termamyl 0.5% soluble starch 30-60 ppm calcium 5.7

**Parameters**

To illustrate the activity of Termamyl in dependence of temperature at test conditions, i.e. without the stabilizer starch concentrations above 0.5%. Activity can also be expressed as an initial rate of (equivalent) increase for a given enzyme concentration rate of DE increase over a given time will in the stability. For a 0.1% w/w dosage of Termamyl 60 L are as fol-

	90°C	95°C	100°C	105°C
Rate/hour	5.1	5.5	5.9	6.2
Increase over (standard cond.)	5.1	5.3	5.3	4.3

**Termamyl Stability - Influence of Calcium**

In a starch slurry, Termamyl is satisfactorily stabilized in the presence of 50-70 ppm Ca<sup>++</sup>. In table 1, figures for the Termamyl stability in a 30% starch slurry are shown as a function of pH and temperature for three different levels of Ca<sup>++</sup> (ppm). The data are considered valid for DE values in the range of 0-12.

**Table 1. Termamyl stability (enzyme half-lives in minutes)**

	93°C	98°C	103°C	107°C
<b>Ca<sup>++</sup> 70 ppm</b>				
pH 6.5	1500	400	100	40
pH 6.0	800	200	75	20
pH 5.5	300	75	25	10
<b>Ca<sup>++</sup> 20 ppm</b>				
pH 6.5	450	125	40	10
pH 6.0	250	75	20	5
pH 5.5	100	25	5	2
<b>Ca<sup>++</sup> 5 ppm</b>				
pH 6.5	150	40	10	4
pH 6.0	75	20	5	2

**Termamyl Inactivation**

For certain purposes (paper industry and certain food processing industries), it is very important to inactivate any residual Termamyl activity in a dextrin or syrup. This can best be done by thermal treatment at low pH. Table 2, showing figures for Termamyl stability at low pH may serve to establish the guidelines for such treatment.

**Table 2. Termamyl stability (enzyme half-lives in minutes)**

	90°C	95°C	100°C
<b>Ca<sup>++</sup> 70 ppm</b>			
pH 3.5	0.1	0.02	(0)
pH 4.0	2	0.4	0.2
pH 4.5	17	7	3
<b>Ca<sup>++</sup> 34 ppm</b>			
pH 3.5	0.03	0.01	(0)
pH 4.0	0.7	0.2	0.04
pH 4.5	10	4	2

Substrate: 30% DS, 20 DE dextrin solution.

**Example**

In a 20 DE dextrin solution at pH 4.0, 95°C, containing 70 ppm of Ca<sup>++</sup>, it takes 4 minutes to reduce the activity to 0.1% of the initial activity (about 10 half-lives).

**Storage**

When Termamyl is stored at a temperature of 25°C, the declared activity is maintained for at least three months. For longer storage periods, a loss in activity of 1-2% per month may occur. When stored at 5°C, the product will maintain the declared activity for at least one year.



## Use of Termamyl® for Starch Liquefaction

### Introduction

Termamyl is used for the enzymatic liquefaction of starch to dextrins. The 1,4- $\alpha$ -linkages are hydrolyzed at random, resulting in a decrease in the viscosity of the gelatinized starch and an increase in the dextrose equivalent (DE).

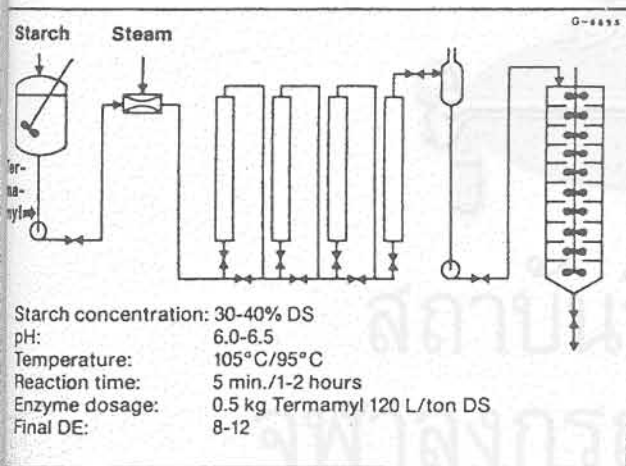
The liquefaction is carried out in such a way as to give the required DE for the subsequent processes. For saccharification to dextrose, a DE of 8-12 is commonly used. Higher DE's are often necessary in maltodextrin production. The maximum DE obtainable is around 40.

### Liquefaction

Termamyl is very heat-stable. At a temperature of 105°C it is highly active and sufficiently stable to allow reaction times which permit thorough gelatinization of the starch without any significant loss of enzyme activity.

On this basis a special liquefaction process has been designed for starch liquefaction, the single dose jet-cooking process (Figure 1).

Fig. 1



### Starch liquefaction process

#### Process

Termamyl is metered into the starch slurry after pH-adjustment, and the slurry is pumped through a jet-cooker. Live steam is injected here to raise the temperature to 105°C, and subsequent passage through a series of holding tubes provides 5 min. residence time, which is sufficient to fully gelatinize the starch. By discharging the partially liquefied starch the temperature is reduced to 90-100°C, and the enzyme is allowed to react further at this temperature for 1-2 hours until the required DE is obtained.

### Operating Parameters

The jet-cooking process is normally carried out under the following conditions:

DS 30-35% (w/w), pH 6.0-6.5, and a Ca<sup>++</sup> content of 20-80 ppm (w/v). The Termamyl dose is typically between 0.5 and 0.6 kg T-120 L per ton of starch (DS).

The enzyme stability depends on the following parameters: temperature, DS, pH, Ca<sup>++</sup> concentration, ion content and DE. More details are given in A 5505.\*)

#### Temperature

The stability of Termamyl (expressed as half life) at different temperatures is as follows:

at 110°C:	15 min.
at 105°C:	50 min.
at 100°C:	200 min.
at 95°C:	700 min.

at DS 35%, pH 6.5, and a Ca<sup>++</sup> content of 40 ppm.

#### Dry Substance

The stability of Termamyl (expressed as half life) at different dry substance concentrations is as follows:

at 35% DS:	50 min.
at 30% DS:	30 min.
at 25% DS:	20 min.

at 105°C, pH 6.5, and a Ca<sup>++</sup> content of 40 ppm.

#### pH

The stability of Termamyl (expressed as half life) at different pH-values is as follows:

at pH 6.5:	200 min.
at pH 6.0:	110 min.
at pH 5.5:	40 min.

at 100°C, DS 35%, and a Ca<sup>++</sup> content of 40 ppm.

#### Calcium Concentration

The stability of Termamyl (expressed as half life) at different Ca<sup>++</sup> concentrations is typically:

at 70 ppm:	100 min.
at 40 ppm:	50 min.
at 10 ppm:	15 min.

at 105°C, pH 6.5, and 35% DS.

### Overall Stability

From the above it is possible to deduce the enzyme stability at nearly any set of conditions. The values for the stabilities shown under »Temperature« are simply corrected for changes in DS, pH, and Ca<sup>++</sup>, in the proportions found under the respective headings.

For example the stability of Termamyl at 105°C, 30% DS, pH 6.0, and 10 ppm Ca<sup>++</sup> can be calculated to be:

$$50 \times \left(\frac{30}{50}\right) \times \left(\frac{110}{200}\right) \times \left(\frac{15}{50}\right) \approx 5 \text{ min. half life}$$

Addition of Ca<sup>++</sup> up to a total of 40 ppm will increase the half life to 16 min.

\*) P. Rosendal, B.H. Nielsen, N.K. Lange, Die Stärke 31 (1979) Nr. 11, 368 "Stability of Bacterial Alpha-Amylase in the Starch Liquefaction Process". Reprints available on request.



## Decay

Residual activity decay follows a first order reaction scheme according to the formula:

$$\exp\left(-\frac{\ln 2}{T_{1/2}} \times t\right)$$

$A_t$  = the residual activity at time  $t$   
 $A_0$  = the activity at time 0  
 $T_{1/2}$  = the enzyme stability (half life) in min.  
 $t$  = the reaction time in min.

Residual activity after 5 min. of reaction at the conditions of the above example (half life = 16 min.):

$$\exp\left(-\frac{\ln 2}{16} \times 5\right) = 80\%$$

## Product Formation

Product formation is carried out at pH 6.0-6.5. Lower pH-values are used in such cases where improved stability can be achieved by other means, e.g. by a reduced reaction temperature. Higher pH-values should be avoided due to increased product formation (e.g. maltulose-precursors). Maltulose formation is enhanced at high temperatures, high pH, and long reaction times, and is more pronounced at increasing DE's. The advantage of Termamyl is thus that the temperature is only raised to 105°C (as compared with 140°C in a *B. subtilis* process).

## Maltodextrins

The above-mentioned process (fig. 1) can be used for the production of maltodextrins (DE 15-25). In that case a higher enzyme dose and/or a longer residence time is usually needed. The DE does not increase proportionally above DE 10-15, and the following may be used as a guideline for dosage calculations:

### Average DE increase per hour per 1 kg enzyme/ton starch DS

	Temp.	1-10 DE	15-25 DE
Termamyl 60 L	95°C	5	3
Termamyl 120 L	95°C	10	6

## Inactivation

In some cases the enzyme must be destroyed completely so that no residual activity is present in the final product, e.g. in maltodextrins.

Termamyl is inactivated by high temperatures and simultaneous low pH. Approximate values for a 20 DE maltodextrin at 30% DS are as follows:

at pH 3.5: 0.5 min. at 95°C  
at pH 4.0: 5 min. at 95°C

More details are given in NOVO brochure B 204, available on request.

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# Novo Enzymes



## AMG

### Description

Amyloglucosidase Novo – is an exo-amylase (glucosylase) produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus niger*. The enzyme hydrolyzes 1,4- as well as 1,6-alpha-linkages in starch hydrolyzates.

During hydrolysis, glucose units are removed in a stepwise manner from the non-reducing end of the substrate molecule. The rate of hydrolysis depends on the chain length: maltose, and in particular maltose being hydrolyzed at a lower rate than higher oligosaccharides.

Furthermore, 1,6-alpha-linkages are broken down more slowly than 1,4-alpha-linkages, but eventually almost complete conversion of starch into glucose is possible.

### Product Types

AMG is available in liquid form as

- AMG 300 L
- AMG 200 L
- AMG 150 L
- AMG 300 L, type Lo-prot

Densities of approximately 1.2 g/ml.

"Lo-prot" has virtually no proteolytic side-activity, the two products only differ with respect to activity.

### Product Specification

Activity	
AMG 300 L (both types)	300 AGU/ml
AMG 200 L	200 AGU/ml
AMG 150 L	150 AGU/ml

### Characteristics

AMG products comply with FAO/WHO JECFA and FCC recommended specifications for food grade enzymes, supplemented with maximum limits of  $5 \times 10^4$ /g for total viable count and  $10^2$ /g for moulds.

### Amyloglucosidase

Amyloglucosidase catalyzes the transfer of a glycosyl moiety from a 1,4-alpha position to a 1,6-alpha position. Saccharification with an amyloglucosidase which contains transglucosidase will lead to the formation of panose and isomaltose.

AMG-products are free from transglucosidase.

### Activity Determination

One Novo Amyloglucosidase unit (1 AGU) is the amount of enzyme which hydrolyzes one micro-mole of maltose per minute under the reaction conditions used in Novo's standard assay procedure:

Substrate	.....	maltose
Reaction time	.....	30 minutes
Temperature	.....	25°C
pH	.....	4.3

A detailed description of the Novo analysis method (AF 22) is

### Applications

**Starch Syrup Industry:** AMG is used for the saccharification of liquefied starch (maltodextrins) for production of dextrose, fructose syrups, and glucose syrups of different compositions.

Saccharification of maltodextrins is carried out batchwise or continuously in large saccharification tanks with a total holding time of between 40 and 100 hours.

For crystalline dextrose or fructose syrup production, the enzyme dosages will be from 0.65 to 0.80 litre AMG 300 L per ton of dry substance – the lower the enzyme dosage, the longer the reaction time.

For glucose syrups, the AMG is normally used together with other saccharifying enzymes and the dosages are considerably lower, i.e. in the range from 0 to 200 ml per ton dry substance.

More detailed information on the application of AMG and other Novo enzymes for starch syrup production is given in separate leaflets available on request.

**Brewing Industry:** AMG is used for the production of beer with reduced carbohydrate content.

When added during mashing, normal type AMG is used and a typical dosage will be 3 litre of AMG 300 L per ton of grist.

When applied during fermentation or lagering, AMG 300 L, type Lo-prot is used at a dosage level around 3-5 ml per hl beer. The absence of proteolytic side-activity is of importance for preserving head retention.

Detailed information on how to produce low-carbohydrate beer using Novo enzymes is given in separate leaflets, available on request.

**Alcohol Industry:** Amyloglucosidase is used for the production of alcohol from starch-containing raw materials. For this application, Novo's amyloglucosidase is marketed under the name of SAN – Spiritamylase Novo, – and a special product sheet describing this enzyme as well as leaflets on its application are available on request.

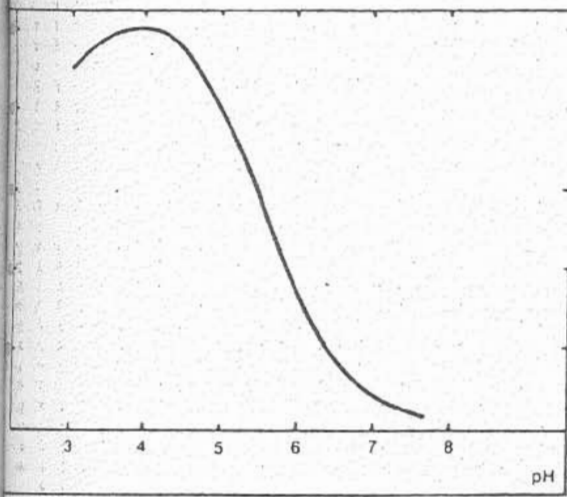
### Solubility

The active enzyme components of AMG are readily soluble in water at all concentrations which occur in normal usage. Turbidity which may occur in the enzyme preparation has no influence on the volumetric activity or handling characteristics of the product.

### Handling Precautions

The product is non-flammable and completely miscible with water. Unnecessary contact with the product or inhalation of dust from the dried product should be avoided. In case of spillage or accidental contact with skin or eyes, rinse by flushing with water.

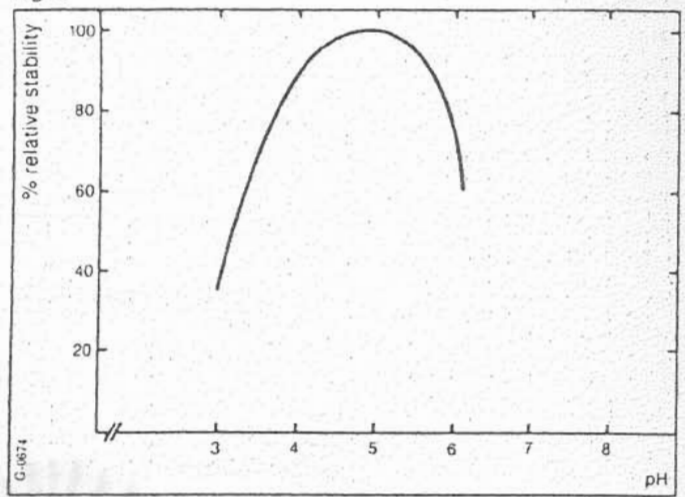
A separate Novo leaflet, "Precautionary Measures", for liquid products is available on request.



Influence of pH on the activity of AMG

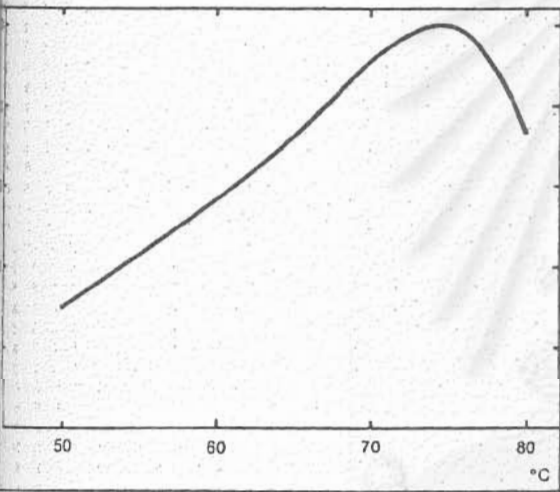
Substrate: 30% w/w maltose, 0.1 M phosphate/citrate buffer (McIlvaine), 55°C  
 Holding time: 30 minutes

Fig. 3



Influence of pH on the stability of AMG

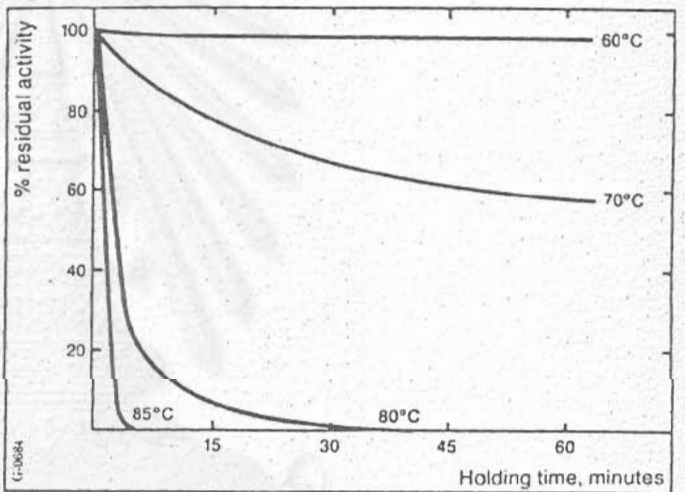
Substrate: 35% w/w dextrose syrup, 60°C  
 Holding time: 48 hours  
 Stability measured as half-life at the pH given.



Influence of temperature on the activity of AMG

Substrate: 30% w/w maltose, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5  
 Holding time: 30 minutes

Fig. 4



Influence of temperature on the stability of AMG

Substrate: 35% w/w dextrose syrup, pH 4.5  
 Stability measured as residual activity after the time given.

When AMG is stored at a temperature of 25°C, the declared activity is maintained for three months. For longer storage periods, a loss in activity of 1-2% per month may occur. When stored at 5°C, the product will maintain the declared activity for one year.

### Activity and Stability Parameters

The influence of pH and temperature on the activity of AMG is shown in figures 1 and 2, respectively. In industrial applications, reaction times are normally considerably longer than those used for the test, hence the enzyme stability must also be taken into account. The influence of pH and temperature on the stability of AMG is illustrated in figures 3 and 4, respectively.

For optimal activity and stability during the long reaction times (40-100 hours) which are used in the industry for production of glucose syrup, the pH optimum is around 4.5 and the temperature optimum is 60°C.

Beside pH and temperature, other parameters, e.g. dry substance also influence the performance of the enzyme. The recommended conditions therefore depend on the actual application and are given in the respective application leaflets.

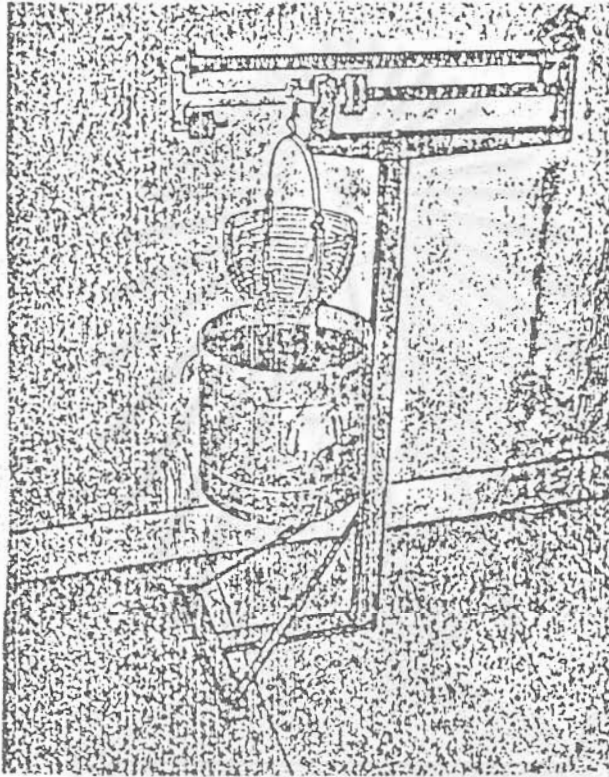
SOLE DISTRIBUTERS IN THAILAND  
 THE EAST ASIATIC COMPANY (THAILAND) LTD.

CHEMICALS DEPARTMENT  
 53-55 ORIENTAL AVENUE  
 BANGKOK  
 TEL. 293 1021

SUREN

## Appendix 2

## การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนโดยการแทนที่น้ำ



รูปที่ 7 แสดง เครื่องมือที่ใช้หา % แอมโมเนียไนโตรเจนในหัวมันสำปะหลัง

วิธีการหา % แอมโมเนียไนโตรเจนในหัวมันสำปะหลัง

1. เติมน้ำลงในถังให้ท่วมตะกร้าใบล่าง
2. เลื่อนลูกตุ้มน้ำหนักของคันชั่งทั้งสองไปอยู่ที่เลขศูนย์ แล้วทำการปรับเครื่องวัด % แอมโมเนียไนโตรเจนให้ได้ระดับสมดุลย์
3. เลื่อนลูกตุ้มน้ำหนักของคันชั่งที่สอง (ลูกตุ้มลูกใหญ่) ไปที่ 5 กิโลกรัม, จากนั้นจึงนำมันสำปะหลังสดใส่ลงในตะกร้าใบบนให้ได้น้ำหนัก 5 กิโลกรัมพอดี
4. นำมันสำปะหลังทั้ง 5 กิโลกรัมใส่ลงในตะกร้าใบว่างพร้อมกับเลื่อนลูกตุ้มน้ำหนักลูกใหญ่มายังอยู่ที่ศูนย์ดังเดิม จากนั้นจึงเลื่อนลูกตุ้มน้ำหนักลูกเล็กของคันชั่งอันบนไปทางขวามือ จนได้สมดุลย์
5. อ่านค่า % แอมโมเนียไนโตรเจน จากสเกลที่คันชั่งอันบน
6. ทดลอง 3 ครั้ง เพื่อนำไปหาค่าเฉลี่ย

### ตัวอย่างการเตรียมสารละลายแป้ง

ขี้แป้งมันสำปะหลัง	300	กรัม
เติมน้ำ	700	กรัม
จะได้สารละลายแป้ง	30%	(โดยน้ำหนัก)

ในงานวิจัยนี้เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังครั้งละประมาณ 2 - 3 กิโลกรัม  
จึงแบ่งลงใน flask ๗ ละประมาณ 500-1000 กรัม เพื่อไฮโครไลส์ได้สมบูรณ์ขึ้น

### ตัวอย่างการเตรียมสารละลายแป้งในมันสด

น้ำหนักมันสำปะหลัง เริ่มต้น	3124.2	กรัม
น้ำหนักเปลือกมันสำปะหลัง	406.6	"
น้ำหนักเนื้อมันสำปะหลัง	2717.6	"
น้ำหนักมันสดหลังบดเหลือ	2491.6	"

สมมติฐาน มีแป้ง 30% โดยน้ำหนักในหัวมันสด

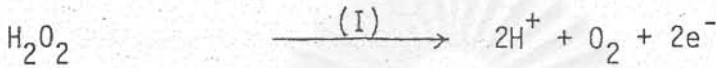
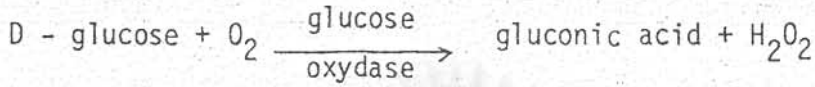
ดังนั้น	ขี้มันมันสด (บดแล้ว)	1000	กรัม
	เติมน้ำ	700	กรัม
จะได้สารละลายแป้ง	=	$\frac{300}{1700} \times 100$	= 17.6%

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Appendix 3

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยใช้เครื่อง glucose analyser YSI model 27

โดยอาศัยหลักการ คือ



ละลายสารให้เจือจาง แล้วฉีดด้วย injector ผ่าน polycarbonate membrane ซึ่งจะ limit การแพร่ของ enzyme glucose oxydase หลังจากเกิดปฏิกิริยาของ glucose oxydase ที่ membrane  $H_2O_2$  จะผ่านสู่ cellulose acetate membrane กระแสที่เกิดขึ้น ระหว่างขั้ว anode (ปฏิกิริยาที่ I) และขั้ว cathode (ปฏิกิริยาที่ II) จะเป็นสัดส่วนกับ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย ในการทดลองทุกครั้งต้อง calibrate เครื่องด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 2 กรัม/ลิตร

การคำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น

เมื่อใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลัง 30% (โดยน้ำหนัก) มาไฮโดรไลส์ ตวงปริมาตรของ starch hydrolysate มา 1 มล. เจือจางด้วยน้ำไทปริมาตรรวม 500 มล. นำสารละลายนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง glucose analyser อ่านค่าได้ 64 มก/คต. เพราะฉะนั้น % น้ำตาลกลูโคส = 32 กรัม/100 กรัมสารละลาย

เมื่อใช้สารละลายหัวมันสด

น้ำหนักรวมของน้ำ, กาก และแป้ง	=	1700	กรัม
น้ำหนักเฉพาะสารละลายน้ำตาลกลูโคส (กรองกากออก)	=	1154.1	กรัม
ปริมาตรเฉพาะสารละลายน้ำตาลกลูโคส	"	1060	มล.
น้ำหนักกากมันสำปะหลัง	=	545.9	กรัม

ตวงสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ไฮโดรไลส์ได้ 1 มล. เจือจางด้วยน้ำ 100 มล. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง glucose analyser อ่านค่าได้ 160 มก/ดล.

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย = (160) (1060) มก.

นำกากมันที่เหลือมาละลายในน้ำ 800 มล. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ติดอยู่ในกากมัน

นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์น้ำตาล อ่านค่าได้ 100 มก/ดล.

ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในกากมัน = (100) (800) มก.

$$\begin{aligned} \text{เพราะฉะนั้น \% น้ำตาลกลูโคส} &= \left[ \frac{(100)(800) + (160)(1060)}{(1700)(1000)} \right] \times 100 \\ &= 14.70 \end{aligned}$$

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## Appendix 4

## การวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลาย, กรด และองค์ประกอบของก๊าซ

ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารอาหารต่าง ๆ

## 1. การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณตัวทำละลายและกรด

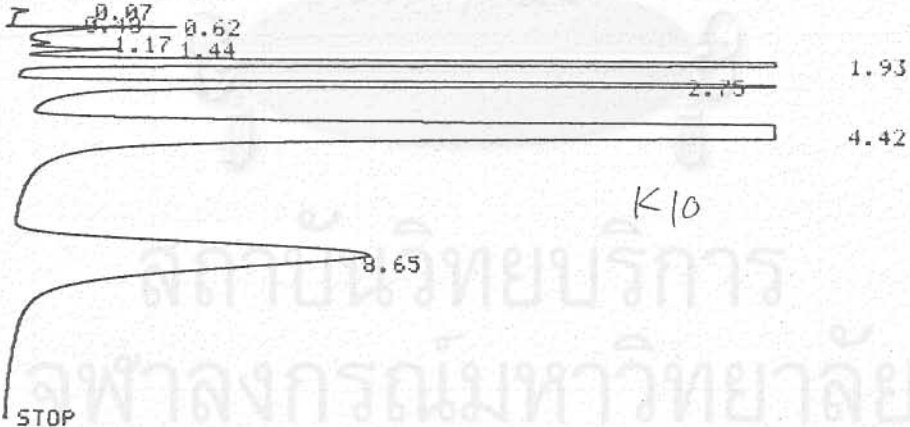
ในงานวิจัยนี้ใช้ gas chromatography ของ Shimadzu model GC 7AG กับ recorder integrator ของ chromatopac CR1A เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณตัวทำละลายและกรด

สภาวะที่ใช้มีดังนี้

Column ยาว 2 เมตร, ขนาด  $\frac{1}{8}$ " บรรจุด้วย porapak Q 80-100 mesh, อุณหภูมิของ column คงที่ที่  $210^{\circ}\text{C}$ , อุณหภูมิของ injector  $280^{\circ}\text{C}$ , อุณหภูมิของ detector  $300^{\circ}\text{C}$ , อัตราการไหลของก๊าซ  $\text{N}_2$  50 มล./นาที

รูปข้างล่างแสดงตัวอย่าง chromatogram ของบิวทานอล-อาซีโตน-เอทานอล, กรดอาซีติกและกรดบิวทริก

START 10.01.09.10.



C-RIA  
SMPL # 00  
FILE # 5  
REPT # 733  
METHOD 44

#	NAME	TIME	CONC	HK	AREA
		0.07			762
		0.48			196
		0.62			15434
		1.17		V	6116
1	ETOH	1.44	0.2515	V	16730
2	ACE	1.93	4.1934	V	203745
3	AC	2.75	5.2744	V	187281
4	N-BUOH	4.42	9.1601	V	643198
5	AB	8.65	3.88	V	286583
	TOTAL		22.7596		1368050



2. การวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบของก๊าซ

ใช้ gas chromatography ของ GOW-MAC INSTRUMENT CO., SERIES 150, Thermal conductivity detector model 69-152 กับ recorder ของ Shimadzu model R-111

สภาวะที่ใช้นี้ดังนี้

column

- Side A 5m x  $\frac{1}{8}$ " MS 5A 80/100 mesh เพื่อวิเคราะห์ CO และ H<sub>2</sub>

- Side B 3m x  $\frac{1}{8}$ " s.s., Porapak Q 80/100 PQL-2

เพื่อวิเคราะห์ CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>

อัตราการไหลของก๊าซอาร์กอน 30 มล/นาที, อุณหภูมิของ column 60°C, อุณหภูมิของ injector 80°C, อุณหภูมิของ detector 80°C

3. ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นสารอาหารต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์ (กรัม/ลิตร)	อุณหภูมิ 25			อุณหภูมิ 30			อุณหภูมิ 35		
	สารอาหาร (กรัม/ลิตร)			สารอาหาร (กรัม/ลิตร)			สารอาหาร (กรัม/ลิตร)		
	30	50	80	30	50	80	30	50	80
B	1.7633	1.4431	1.2607	4.1945	4.1971	3.8902	4.4122	5.1123	3.9319
A	0.8536	0.7426	0.478	1.646	1.8023	1.4101	1.7969	2.3719	1.678
E	0.0692	0.0626	0.0621	0.137	0.1197	0.1203	0.1457	0.1851	0.1266
AA	0.4962	0.3863	0.3884	0.366	0.3314	0.4192	0.327	0.235	0.4286
BA	0.1061	0.0182	0.0693	-	-	0.104	0.0144	-	0.0232

## Appendix 5

ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate ที่ pH ต่าง ๆ  
และข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมัก starch hydrolysate :

butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA), butyric acid (BA) ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ กัน, ที่ pH 4.5

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (l)	X (no of cell/l.)
	(g/l)							
0	49.0	0.3581	0.2291	0.043	0.0696	-	0	$0.32 \times 10^{12}$
6.5	48.5	0.7680	0.3807	0.0602	0.5762	0.2936	0.59	$0.72 \times 10^{12}$
12.5	48.0	0.6466	0.3234	0.0094	0.4245	0.7015	1.54	$1.53 \times 10^{12}$
17.5	48.0	0.9321	0.4451	0.0785	0.7858	0.7971	-	$10.50 \times 10^{12}$
21.5	47.5	0.8935	0.5052	0.0676	0.8332	0.8464	-	$20.60 \times 10^{12}$
26.5	47.5	0.8446	0.469	0.0628	0.7465	0.968	-	$14.40 \times 10^{12}$
30.5	48.5	0.9664	0.4697	0.0734	0.8813	0.8515	-	$9.65 \times 10^{12}$
39.5	48.0	1.0014	0.6272	0.0542	0.7255	0.8728	-	$4.25 \times 10^{12}$
44.5	45.4	1.2961	0.7055	0.0632	0.8902	0.8792	-	$13.30 \times 10^{12}$
47.0	40.6	1.3481	0.9828	-	0.481	0.6294	2.47	$14.80 \times 10^{12}$

ปริมาตรรวม  $NH_4OH$  ที่ใช้ไปทั้งหมด = 2.0 ml

องค์ประกอบของก๊าซตามช่วงเวลา

เวลา (ชม.)	ปริมาตรรวมของก๊าซ (ลิตร)	องค์ประกอบ % โดยปริมาตร	
		$H_2$	$CO_2$
0	0	0	0
7.3	0.59	87.97	12.03
13.3	0.94	76.96	23.04
19.4	0.93	64.63	35.37
30.0		74.44	25.56
43.3		68.66	31.34

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate:

butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA), butyric acid (BA), ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ กัน, ที่ pH 5.5

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (l)	X (no. of cell/l.)
	(g/l)							
0	51	0.3847	0.273	0.0481	0.0992	-	0	$0.67 \times 10^{12}$
6	48	0.5459	0.2768	0.0321	0.3855	0.247	0.46	$5.20 \times 10^{12}$
13	36	0.7132	0.228	0.0474	1.4404	1.7178	3.38	$18.40 \times 10^{12}$
18	24	3.4583	1.0604	0.1992	2.397	1.1338	6.09	$12.60 \times 10^{12}$
24	16	6.2127	2.6981	0.244	2.0153	0.2576	10.93	$16.70 \times 10^{12}$
29	10	8.2379	3.9785	0.2023	1.3079	0.2343	14.53	$8.55 \times 10^{12}$
37.5	3	9.7579	4.6636	0.3115	1.2485	0.9922	17.79	$15.60 \times 10^{12}$
41.5	3	6.9978	3.1981	0.1585	0.8122	0.6496	17.79	$15.20 \times 10^{12}$
60.5	3	9.0175	4.1933	0.2632	1.0298	1.1046	17.79	$13.90 \times 10^{12}$

ปริมาตรรวม  $NH_4OH$  ที่ใช้ไปทั้งหมด = 29.5 ml.

องค์ประกอบของก๊าซตามช่วงเวลา

เวลา (ชม.)	ปริมาตรรวมของก๊าซ (ลิตร)	องค์ประกอบ (% โดยปริมาตร)	
		$H_2$	$CO_2$
0	0	0	0
6.5	0.46	85.29	14.71
15.7	2.71	52.44	47.56
25	4.85	39.13	60.87
30.5	3.60	35.20	64.80

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมัก starch hydrolysate: butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA) butyric acid (BA), ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ กัน, ที่ pH 6.5

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (l)	X (no of cell/l)
	(g/l)							
0	51.5	0.6987	0.3525	0.0415	0.2595	0.0195	0	$0.29 \times 10^{12}$
6	45.5	0.621	0.2472	0.0107	0.4083	0.4597	0.92	$1.95 \times 10^{12}$
12.5	40.0	1.2694	0.5133	0.1338	1.9704	2.2523	3.17	$6.98 \times 10^{12}$
18.5	29.5	2.054	0.9654	0.1413	2.3681	2.6319	6.32	$6.67 \times 10^{12}$
24.5	27.0	3.3174	1.5717	0.1706	2.9608	3.0034	9.63	$6.90 \times 10^{12}$
29.5	19.0	4.6147	2.1116	0.1992	3.5392	3.1955	13.03	$4.82 \times 10^{12}$
37.0	13.6	6.3962	3.0316	0.227	4.2132	3.4343	16.13	$5.28 \times 10^{12}$
42.5	8.8	7.1602	3.4508	0.2381	4.8025	3.7768	18.59	$6.90 \times 10^{12}$
48.5	3.0	8.0765	3.6769	0.2395	4.7927	3.5416	21.66	$4.08 \times 10^{12}$
54.5	0.2	9.1601	4.1934	0.2515	5.2744	3.88	23.86	$1.86 \times 10^{12}$
61.5	0.2	8.944	3.996	0.2593	5.3561	4.1059	24.08	$2.42 \times 10^{12}$

ปริมาตรรวม  $NH_4OH$  ที่ใช้ไปทั้งหมด = 34.2 ml

องค์ประกอบของก๊าซตามช่วงเวลา

เวลา (ชม.)	ปริมาตรรวมของก๊าซ (ลิตร)	องค์ประกอบ (% โดยปริมาตร)	
		$H_2$	$CO_2$
0	0	0	0
7.0	0.92	88.83	11.17
14.5	2.25	51.86	48.14
19.0	3.15	47.03	52.97
25.0	3.31	53.85	46.15
31.0	3.40	50.40	49.60
50.0	3.07	45.38	54.62
54.5	2.20	50.93	49.07

## Appendix 6

## ข้อมูลการหมัก cassava hydrolysate, dextrose

## และข้อมูลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซ

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก cassava hydrolysate : butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA), butyric acid (BA) ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ, ที่ pH 6.5

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (l)	X (no of cell/l)
	(g/l)							
0	53	0.5056	0.1513	0.0117	0.3669	0.057	0	$2.88 \times 10^{12}$
6.5	46	0.7636	0.3892	0.0531	0.7881	0.5138	0.36	$7.20 \times 10^{12}$
11.5	38.5	0.973	0.4632	0.0825	1.9146	2.0723	3.73	$18.30 \times 10^{12}$
17.5	27.5	2.0663	0.9794	0.1098	2.1275	2.1164	7.70	$17.10 \times 10^{12}$
13.5	16.5	4.022	2.0482	0.15	2.5786	2.257	11.64	$18.50 \times 10^{12}$
30.5	6.0	5.2769	2.7147	0.1101	2.5078	1.9228	16.90	$22.20 \times 10^{12}$
35.5	4.4	7.0385	3.5816	0.1937	2.8755	1.7987	18.80	$16.00 \times 10^{12}$
41.5	0.4	9.4939	4.8861	0.2612	3.8955	3.0115	21.75	$20.50 \times 10^{12}$
47.0	0.4	9.1679	4.5335	0.1605	3.2499	2.1629	21.75	$12.90 \times 10^{12}$
55.0	0.4	9.4434	4.8951	0.2423	3.3824	2.2892	21.75	$8.62 \times 10^{12}$
60.5	0.4	8.643	4.2645	0.2332	3.2127	2.1658	21.75	$10.40 \times 10^{12}$
68.5	0.4	9.5096	4.8592	0.2698	3.1769	2.0412	21.75	-

ปริมาตรรวม  $NH_4OH$  ที่ใช้ไปทั้งหมด = 23.5 ml.

องค์ประกอบของก๊าซตามช่วงเวลา

เวลา (ชม.)	ปริมาตรรวมของก๊าซ (ลิตร)	องค์ประกอบ (% โดยปริมาตร)	
		$H_2$	$CO_2$
0	0	0	0
16.7	3.96	46.50	53.50
23.7	3.95	41.88	58.12
31.7	5.26	42.77	57.23
35.7	1.90	42.88	57.12
42.7	2.95	59.52	40.48

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ได้จากหมัก dextrose : butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA), butyric acid (BA) ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), ปริมาตรรวมของก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) ที่เกิดขึ้น (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ กัน, ที่ pH 5.5

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (l)	X (no of cell/ $l_1$ )
	(g/l)							
0	46	0.3952	0.3025	0.0426	0.1751	-	0	$0.44 \times 10^{12}$
10	45.5	0.464	0.1312	0.0082	0.4038	0.4379	1.45	$0.45 \times 10^{12}$
16.5	39	1.7147	0.6412	0.0548	1.0061	0.4777	3.31	$1.31 \times 10^{12}$
22	32	3.2689	1.3074	0.1567	0.9233	0.2329	5.03	$17.12 \times 10^{12}$
28	26	4.5458	1.8749	0.0798	0.4516	0.1	7.26	$19.72 \times 10^{12}$
34	19.5	6.484	2.7127	0.1884	0.7562	0.1763	9.84	$14.80 \times 10^{12}$
40.5	14.5	7.9676	3.1107	0.2644	0.6985	0.1132	12.12	$9.76 \times 10^{12}$
46	11.0	8.9897	2.0996	0.2859	0.7639	0.1814	13.62	$9.04 \times 10^{12}$
54.5	8.6	10.6163	4.4517	0.2164	0.3498	0.1003	15.55	$16.36 \times 10^{12}$
59	7.0	10.4221	4.3235	0.3107	0.6313	0.1817	15.95	$21.56 \times 10^{12}$
65	6.0	10.852	4.5265	0.3623	0.79	0.2839	16.23	$19.28 \times 10^{12}$
70	5.9	10.9137	4.4259	0.2205	0.2563	0.1404	16.38	$22.96 \times 10^{12}$
76	5.1	11.580	4.4929	0.3387	0.6093	0.1127	16.46	$8.84 \times 10^{12}$
82	4.9	10.9014	4.3751	0.227	0.2414	0.1551	16.50	$3.84 \times 10^{12}$
88	4.7	10.7843	4.0107	0.2197	0.2652	0.2138	16.52	$0.44 \times 10^{12}$

ปริมาตรรวม  $NH_4OH$  ที่ใช้ไปทั้งหมด = 10.1 ml.

องค์ประกอบของก๊าซตามช่วงเวลา

เวลา (ชม.)	ปริมาตรรวมของก๊าซ (ลิตร)	องค์ประกอบ (%) โดยปริมาตร)	
		$H_2$	$CO_2$
0	0	0	0
9	1.45	83.59	16.41
44	1.50	31.20	68.80
55	1.93	39.78	60.22
72.5	0.15	49.17	50.83

## Appendix 7

## ข้อมูลการหมัก starch hydrolysate แบบต่อเนื่อง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก starch hydrolysate:

butanol (B), acetone (A), ethanol (E), acetic acid (AA) butyric acid (BA), ปริมาณกลูโคสที่เหลือใน fermentation broth (S), อัตรา

การเกิดก๊าซ ( $H_2$ ,  $CO_2$ ) (V), biomass (X), ที่เวลา (Time) ต่าง ๆ

โดยทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่องก่อนแล้วตามด้วยการหมักแบบต่อเนื่องที่  $D = 0.15$  ชั่วโมง<sup>-1</sup>

pH 6.5, อุณหภูมิ 30°C ความเข้มข้นของกลูโคสใน starch hydrolysate = 50 กรัม/ลิตร

Time (hr)	S	B	A	E	AA	BA	V (ml/min)	X (no of cell/l)
	(g/l)							
Batch operation								
0	42.5	0.3751	0.2268	0.0391	0.1022	0.0108	0	$4.30 \times 10^{12}$
17.5	37.5	1.4731	0.5089	0.0798	1.5103	0.9826	6.25	$24.60 \times 10^{12}$
Continuous operation								
22	34.5	2.0191	0.7876	0.0903	1.3783	0.4766	3.10	$13.80 \times 10^{12}$
25.5	35	2.1614	0.8062	0.0943	1.5569	0.695	3.70	$19.50 \times 10^{12}$
28	33.5	1.8874	0.74	0.0925	1.5811	0.8499	3.30	$16.40 \times 10^{12}$
34.5	31.5	2.1043	0.7839	0.096	1.8996	1.2408	2.70	$20.80 \times 10^{12}$
37	33.5	2.0506	0.7297	0.0905	1.8548	1.1733	3.00	$14.40 \times 10^{12}$
39.5	33	1.9109	0.6347	0.0806	1.5525	0.9214	4.50	$15.00 \times 10^{12}$
42.5	29.4	2.3151	0.7365	0.0872	1.7824	0.8851	7.60	$12.20 \times 10^{12}$
45.5	28.2	3.1413	1.2635	0.1026	1.7755	0.5187	6.30	$12.60 \times 10^{12}$
48.5	24.8	3.8515	1.7349	0.1248	1.6249	0.3848	6.70	$26.10 \times 10^{12}$
51.5	26.4	4.3681	1.972	0.143	1.6451	0.4562	16.90	$14.70 \times 10^{12}$
58.0	30.0	3.6441	1.5647	0.1244	1.3666	0.3906	6.77	$15.00 \times 10^{12}$
61.5	31.0	3.0121	1.1227	0.1136	1.3647	0.6209	3.62	$13.20 \times 10^{12}$

อัตรา  $NH_4OH$  ที่ใช้ไป = 1.91 ml/hr.

## Appendix 8

ข้อมูลการคำนวณ  $\mu$  และ  $v$  ของตัวทำละลาย

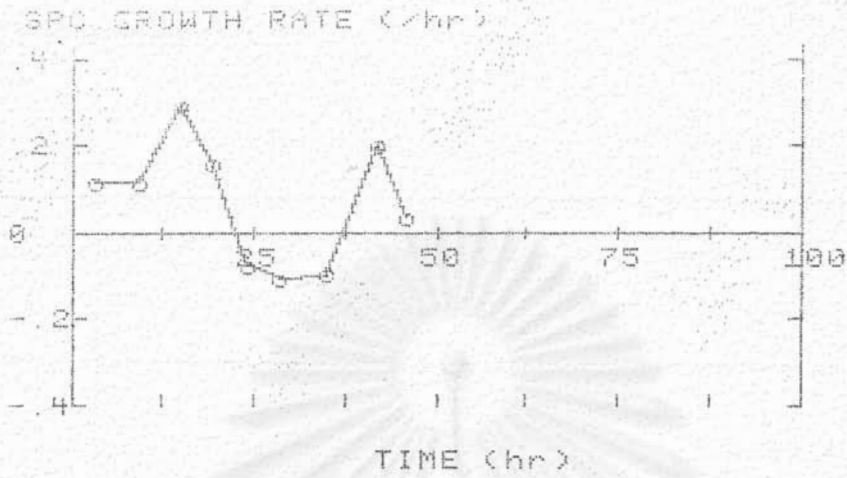
การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

สารอาหาร : Starch hydrolysate ที่ pH 4.5

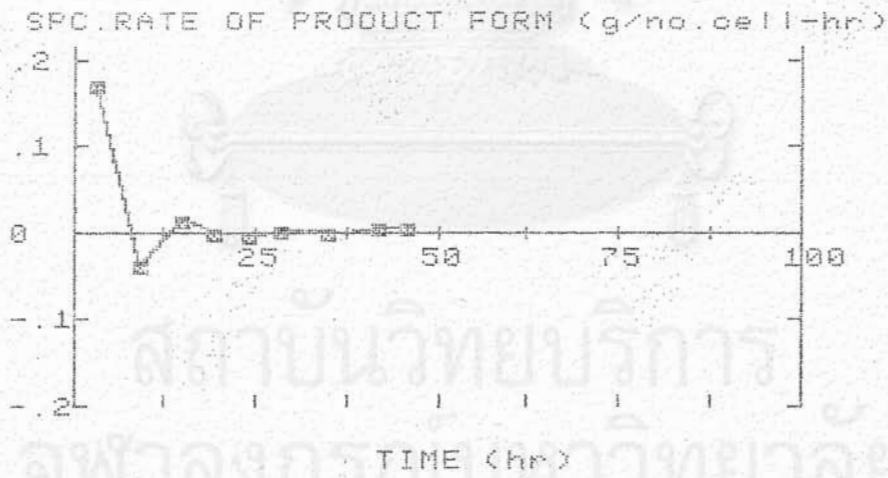
ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
3.25	.118251545	.172373222
9.5	.121009651	-.0340757239
15	.298254364	.015837074
19.5	.162379421	1.70418003E-04
24	-.0708571429	-1.02742857E-03
28.5	-.0987525988	3.18295218E-03
35	-.0863309353	2.45083933E-03
42	.206267806	8.70655271E-03
45.75	.0427046263	7.5758007E-03

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





graph of spc. growth rate



graph of spc. rate of product form.

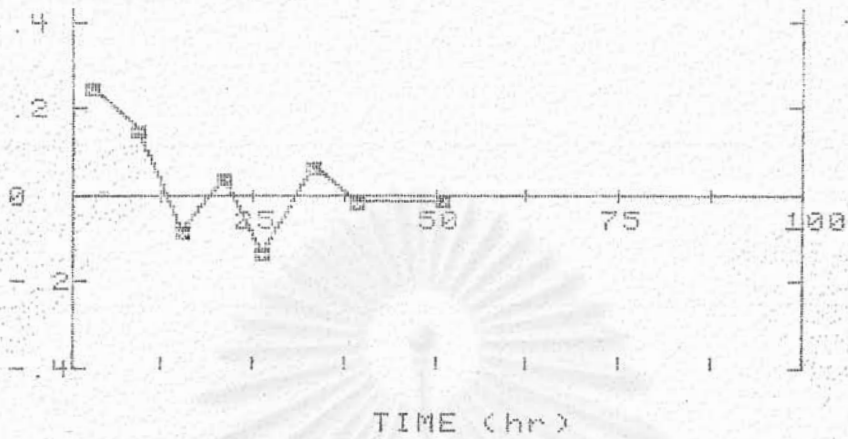
starch hydrolysate pH 4.5

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

สารอาหาร : Starch hydrolysate ที่ pH 5.5

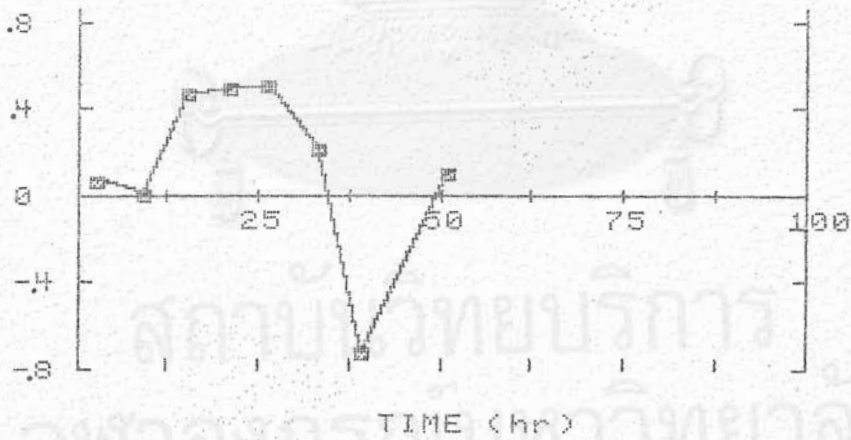
ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
3	.257743677	8.46831485E-03
9.5	.159806295	1.61985472E-03
15.5	-.0748387096	.04812
21	.0466439135	.050476678
26.5	-.129108911	.0517116832
33.25	.0686883449	.0225443917
39.5	-6.49350653E-03	-.0710811689
51	-4.70247785E-03	.0112844999

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SPC. GROWTH RATE ( $\lambda$ /hr)

graph of spc. growth rate

SPC. RATE OF PRODUCT FORM (g/no.cell-hr)



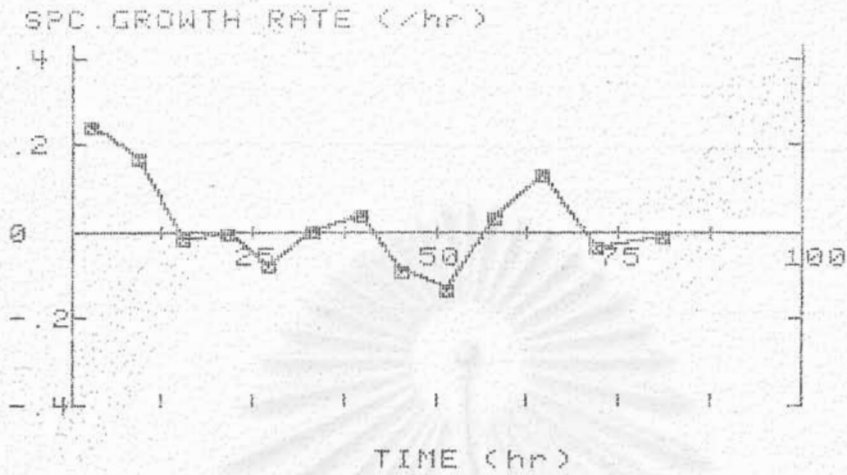
graph of spc. rate of product form.

starch hydrolysate pH 5.5

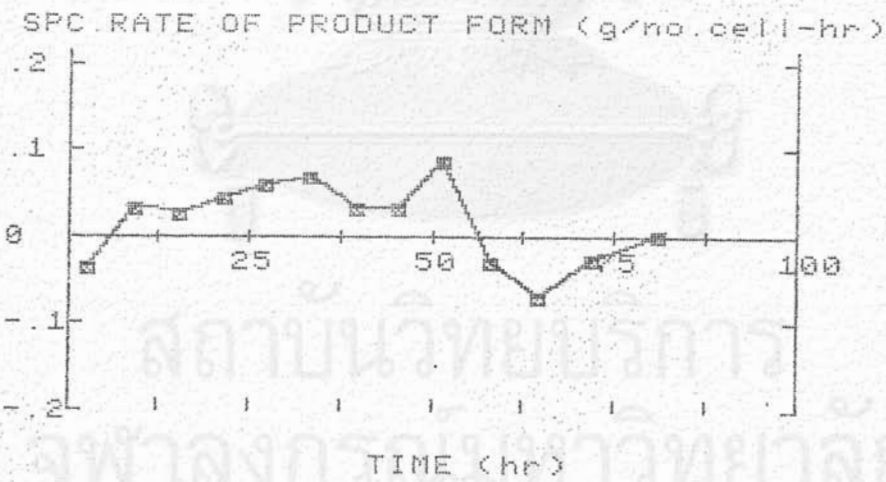
การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

สารอาหาร : Starch hydrolysate ที่ pH 6.5

ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
3	.24702381	-.0318154762
9.25	.173313808	.035751572
15.5	-7.57020763E-03	.0303833944
21.5	5.64971758E-03	.0466470155
27	-.0709397611	.063679181
33.25	.0121452145	.0720607261
39.75	.0483654277	.035656068
45.5	-.0856102004	.0347237402
51.5	-.124579125	.0904657687
58	.0373831775	-.0270827769
64.5	.136104319	-.0657742461
71.75	-.0288957688	-.0238183694
81.25	-3.44753286E-03	5.86726993E-03



graph of spc. growth rate



graph of spc. rate of product form.

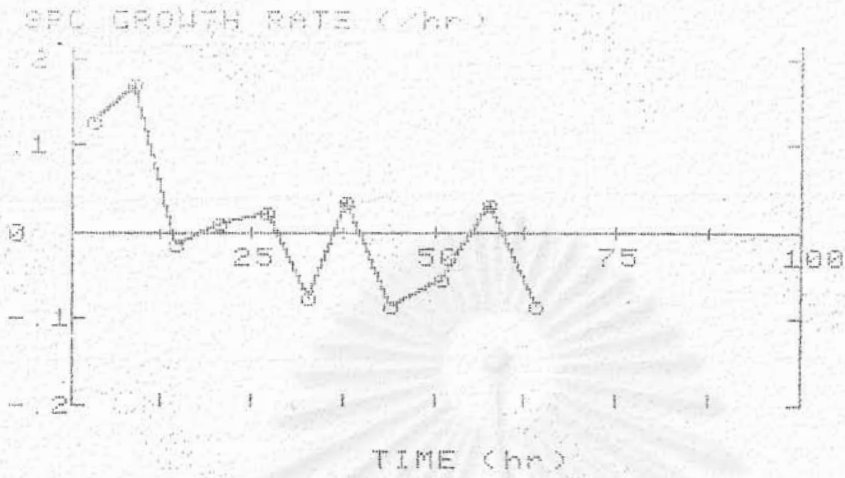
starch hydrolysate pH 6.5

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

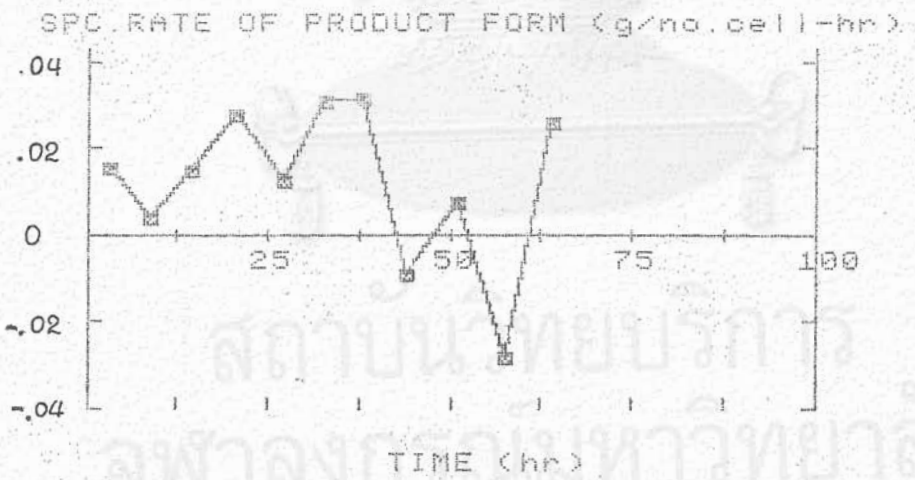
สารอาหาร : Cassava hydrolysate ที่ pH 6.5

ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
3.25	.131868132	.0164010989
9	.174117647	4.90666667E-03
14.5	-.011299435	.0154124294
20.5	.0131086142	.0286020599
27	.025974026	.0132783433
32.75	-.0721349622	.0315543921
38.25	.0379346681	.0322646997
44.25	-.0827436037	-8.48448554E-03
51	-.0497211896	8.3515335E-03
57.75	.0340311634	-.0275327408
64	-.0820367751	.0264833805

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



graph of spc. growth rate



graph of spc. rate of product form.

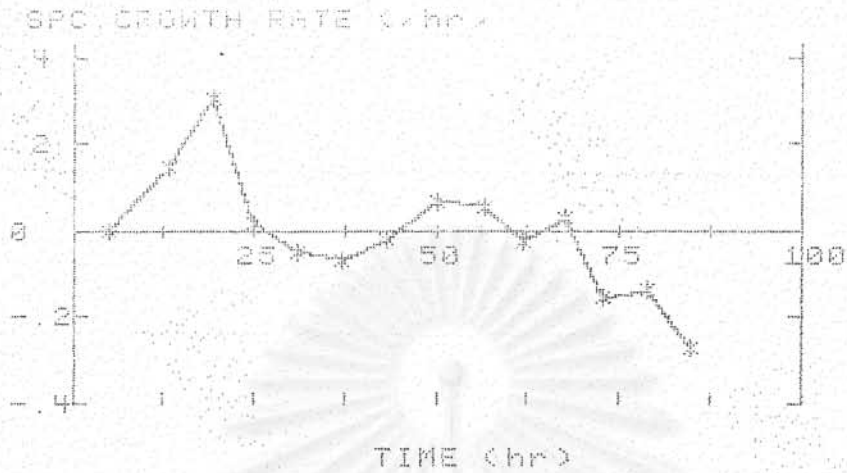
cassava hydrolysate pH 6.5

การหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

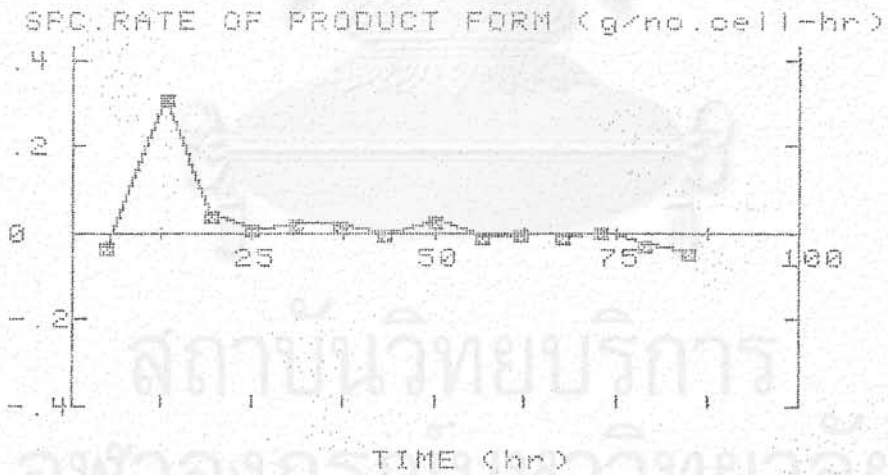
สารอาหาร : Dextose  $\frac{d}{t}$  pH 5.5

ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
5	2.87511229E-03	-.0307502246
13.25	.149933627	.315674562
19.25	.311941992	.0458205495
25	.0235251538	.0159925805
31	-.0475086906	.027854384
37.25	-.0631420697	.0245251816
43.25	-.013926499	6.28626818E-04
50.25	.0678091709	.0362130616
56.75	.060947023	-2.67346462E-03
62	-.0186092067	5.58684295E-03
67.5	.0348484848	-1.71117423E-03
73	-.148008386	8.9266247E-03
79	-.131440589	-.0238748683
85	-.265357031	-.0381041476





graph of spc. growth rate



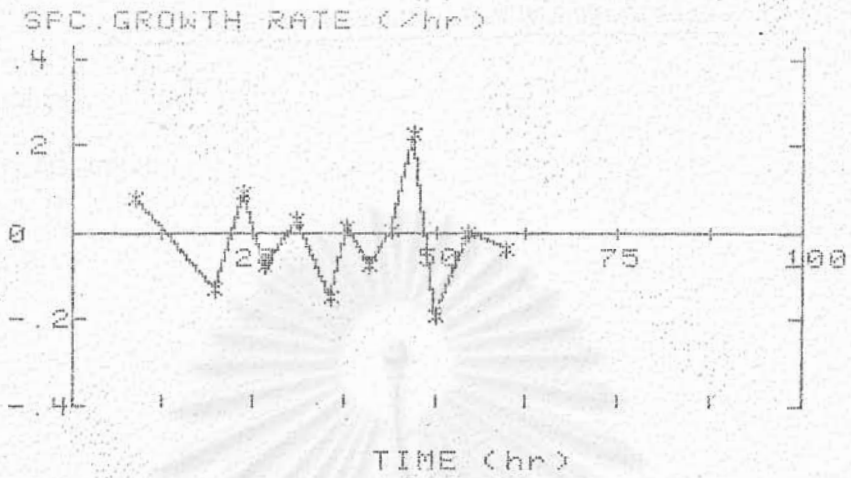
graph of spc. rate of product form.

dextrose pH 5.5

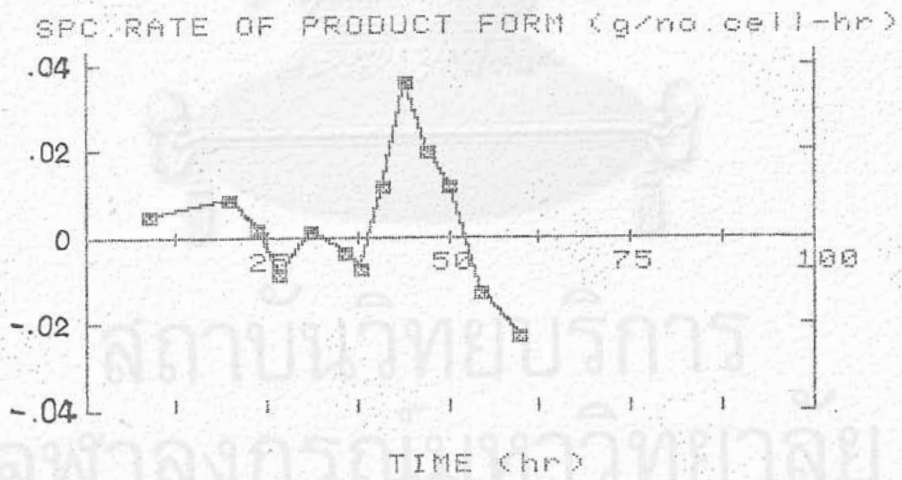
การหมักแบบต่อเนื่อง

สารอาหาร : Starch hydrolysate ที่ pH 6.5

ave. time ( hr )	spc. growth rate ( hr <sup>-1</sup> )	spc. rate of product form. ( x10 <sup>-12</sup> g/no. of cell-hr )
8.75	.0802768166	5.61858626E-03
19.75	-.125	9.66666667E-03
23.75	.0978120978	2.82968682E-03
26.75	-.06908078	-7.62116991E-03
31.25	.0363937138	2.18610422E-03
35.75	-.145454545	-2.57727271E-03
38.25	.0163265307	-6.65578233E-03
41	-.068627451	.0125637255
44	.0107526882	.0367903225
47	.23255814	.0207372954
50	-.18627451	.0126127451
54.75	3.10800312E-03	-.0119129759
59.75	-.0364741642	-.0219817629



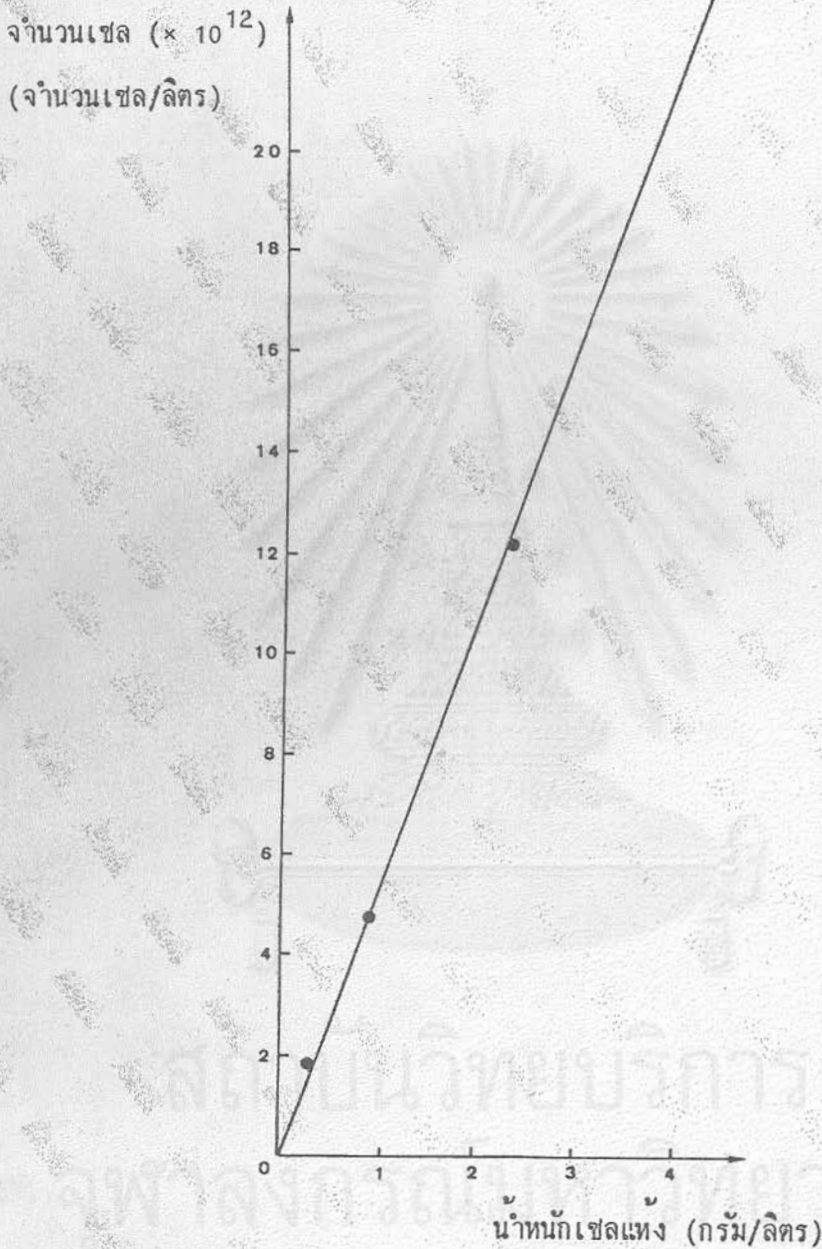
graph of spc. growth rate



graph of spc. rate of product form.

starch hydrolysate pH 6.5  
continuous

## Appendix 9

ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้งวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างสารละลายจากการหมัก 50 มล. กรองด้วย milipore filter ขนาด  $0.22 \mu\text{m}$  ล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง นำ filter ไปอบที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ชั่ง filter หลังจากทำให้เย็นตัวลงเท่าอุณหภูมิห้องใน desicator.